FACULTÉ DE MÉDECINE DE DIJON

Année 1976 - N° 95

ÉTUDE BIOLOGIQUE DES TUMEURS CORTICOSURRÉNALIENNES VIRILISANTES

(Analyse par chromatographie gaz-liquide et chromatographie gaz-liquide couplée à la spectrométrie de masse des stéroïdes urinaires d'un adénome avec déficit partiel en 21-hydroxylase)

THÈSE

présentée
à la Faculté de médecine de DIJON
et soutenue publiquement le 19 Novembre 1976
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par
Madeleine DUBOST
Interne des Hôpitaux de DIJON
née le 23 Juin 1950 à LYON (6ème)

FACULTÉ DE MÉDECINE DE DIJON

Année 1976 - N° 95

ÉTUDE BIOLOGIQUE DES TUMEURS CORTICOSURRÉNALIENNES VIRILISANTES

(Analyse par chromatographie gaz-liquide et chromatographie gaz-liquide couplée à la spectrométrie de masse des stéroïdes urinaires d'un adénome avec déficit partiel en 21-hydroxylase)

THÈSE

présentée
à la Faculté de médecine de DIJON
et soutenue publiquement le 19 Novembre 1976
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par
Madeleine DUBOST
Interne des Hôpitaux de DIJON
née le 23 Juin 1950 à LYON (6ème)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J.B. BOUHEY	:	Doyen
M. A. MARIN	:	Assesseur
M. R. PUTELAT	:	Assesseur
M. J.P. DIDIER	:	Assesseur
M. J. GUERRIN	:	Assesseur

M. J. GUYOT	:	Professeur Honoraire
M. F. BARON	:	Professeur Honoraire
Mlle G. PALLOT	:	Professeur Honoraire

PROFESSEURS TITULAIRES

Anatomie et organogenèse	P. BARRY
Anatomie Pathologique	R. MICHIELS
Biochimie	P. PADIEU
Biophysique	P. GAILLIARD
Carcinologie	F. CABANNE, Doyen Honoraire

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546819_0001

Clinique Chirurgicale	H. VIARD
Clinique Médicale	P. CORTET
Clinique Gynécologique et Obstétricale	J. JAHIER
Clinique Médicale Infantile	M. ALISON
Clinique Neuro-psychiâtrique	J. BALLIVET
Hépatologie - Gastro-entérologie	Cl. KLEPPING
Histologie	G. RUCART
Maladies Infectieuses	F. DESTAING
Médecine légale et Toxicologie	A. MARIN
Pathologie Chirurgicale	C. FERRY
Pathologie Médicale	R. PUTELAT
Physiologie	J. KLEPPING
Sémiologie Médicale	J.B. BOUHEY

PROFESSEURS SANS CHAIRES

Biochimie	J. DEDREUX
Carcinologie	J. GUERRIN
Hématologie et Maladies du sang	A. DUZER
Médecine préventive et Santé publique, Hygiène	M. CARON
Parasitologie	Mme Y. ROUGET
Chirurgie Générale	P. AUPECLE
Radiologie (Diagnostic)	J.P. MABILLE

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie et Organogenèse	J.M. AUTISSIER
Anesthésiologie	B. CAILLARD
Bactériologie, Virologie	A. KAZMIERCZAK
Chirurgie Générale	S. BRIET
	G. PIGANIOL
Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire	M. DAVID
Gynécologie et Obstétrique	J. SALASC
	J.P. FELDMAN
Hématologie et Maladies du sang	J. BONHOMME
Mathématiques, Statistiques, Informatique médicale	Mme L. DUSSERRE
Médecine expérimentale, Immunologie	F. MARTIN
Médecine interne	M. GAUDET
	P. LOUIS
Néphrologie	G. RIFLE
Neurochirurgie	A. THIERRY
Neurologie	A. DUMAS
Orthopédie, Traumatologie, Chirurgie plastique et reconstructive	P. GRAMMONT
Parasitologie	P. CAMERLYNCK
Pédiatrie et Génétique Médicale	J.L. NIVELON
Pharmacologie	A. ESCOUSSE
Physiologie	J.P. DIDIER
Pneumologie, Phtisiologie	L. JEANNIN
Psychiâtrie	P. TRAPET
Radiologie (Radiodiagnostic)	M. WEILLER
	D. BINNERT
Radiologie (Radiothérapie)	J.C. HORIOT
Rhumatologie	J. STRAUSS

AGREGES LIBRES

Dermatologie, Vénéréologie	J.L. CHAPUIS
Ophtalmologie	P.G. MOREAU

LA FACULTE DE MEDECINE DE DIJON DECLARE QUE LES OPINIONS EMISES DANS LES THESES QUI LUI SONT PRESENTEES DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS ET QU'ELLE ENTEND NE LEUR DONNER NI APPROBATION NI IMPROBATION.

JURY DE LA THESE

PRESIDENT

Monsieur le Professeur R. PUTELAT

MEMBRES

Monsieur le Professeur P. GUINET

Monsieur le Professeur P. PADIEU

Monsieur le Professeur R. MORNEX

Monsieur le Professeur Agrégé A. ESCOUSSE

SERMENT D' HIPPOCRATE

Devant l'effigie d'Hippocrate, en présence des Maîtres de cette Faculté et de mes condisciples,

Je promets et je jure d'etre fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai gratuitement mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail ; je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira ni à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Meme sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maitres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois déshonoré et méprisé de mes confrères si j'y manque.

JE DEDIE CETTE THESE

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS .

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PUTELAT

Par sa grande disponibilité, par la profondeur de ses qualités humaines, et par sa recherche constante de la perfection, il nous a fait aimer tous les aspects de la Médecine dès nos premières années d'étude.

Il a éveillé notre intérêt pour l'Endocrinologie, et la rigueur de son raisonnement clinique nous a attirée vers cette discipline toute faite de logique. Ce fut un plaisir pour nous de revenir travailler à ses côtés pendant plusieurs semestres.

Il a fait preuve à notre égard d'un inlassable dévouement et nous a souvent guidée par de précieux conseils. Nous lui savons gré de nous avoir proposé comme sujet de thèse une observation particulièrement originale.

Ayant pris chaque jour davantage conscience de ce que nous lui devions, nous garderons avec fierté le souvenir d'avoir été son élève. Nous le prions de trouver en ce travail l'expression de notre respectueuse reconnaissance et l'affirmation de notre grand attachement.

A NOTRE MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. GUINET

Nous avons une très vive admiration pour son dynamisme étonnant. Il est un enseignant merveilleusement clair et précis, un remarquable pédagogue qui sait tout à la fois mettre en lumière l'essentiel et captiver inlassablement l'attention par d'attrayantes anecdotes.

Il a accepté avec empressement de siéger parmi nos juges ; nous sommes d'autant plus sensible à cet honneur que nous savons l'intérêt qu'il porte aux tumeurs surrénaliennes. Les travaux qu'il a effectués en ce domaine sont une référence fondamentale, et nous osons espérer qu'il ne jugera pas trop sévèrement la faible contribution représentée par notre thèse.

Qu'il veuille bien agréer l'expression de notre profond respect.

A NOTRE MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. PADIEU

Son enthousiasme, son esprit créatif et combattif lui donnent d'être un chercheur renommé et estimé.

Nous n'avons que davantage apprécié qu'il ait accueilli aussi chaleureusement dans son Laboratoire le clinicien profane que nous étions. Il nous a largement accordé sa confiance dans la réalisation pratique de l'étude biochimique pure de notre observation.

Nous lui adressons nos sincères et respectueux remerciements.

A NOTRE MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. MORNEX

Nous avons eu le privilège d'effectuer un semestre d'Interne dans son Service, où règne une ambiance toute imprégnée de sa personnalité forte et accueillante.

Le haut niveau de l'équipe de recherche qu'il a constituée n'est que l'illustration de sa science profonde et de sa claire intelligence. Sa puissance de travail, sa rigueur et son esprit d'organisation resteront pour nous un modèle, tout autant que son sens du détail clinique et que ses qualités d'homme.

Nous sommes très honorée de sa présence dans notre jury de thèse ; cela ne fait qu'accroître la respectueuse gratitude que nous lui devions déjà pour la bienveillance qu'il nous a souvent témoignée.

A NOTRE MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE A. ESCOUSSE

Nous avons travaillé longuement à ses cotés, avec un plaisir intarrissable grâce à l'atmosphère très détendue qu'il sait créer. Il a guidé nos premières activités de laboratoire dans le cadre de nos études à la Faculté des Sciences.

Son orientation de fondamentaliste ne l'empêche pas de manifester continuellement son intérêt pour les sciences cliniques.

Il n'a pas participé à ce travail, mais nous le prions de l'accepter en témoignage de notre gratitude et de notre respectueuse sympathie.

A MONSIEUR LE VOCTEUR R.J. BLGUE

Sans lui ce travail n'aurait pas été réalisable. Son interprétation éblouissante des spectres de masse force notre admiration. Il nous a été particulièrement agréable de bénéficier de son aide ; sa compétence n'a d'egale que sa courtoisie et sa disponibilité. Nous l'assurons de notre gratitude et de notre amitié.

A MADAME LE DOCTEUR C. RIFLE

Elle a largement contribué à notre formation en nous inculquant avec netteté les notions sémiologiques de base. Nous avons toujours trouvé en elle une interlocutrice disponible pour une discussion enrichissante. Elle a accepté que ce travail utilise le dossier d'une malade qu'elle a suivie personnellement, et nous a fait bénéficier de son agréable collaboration. Nous lui adressons nos sincères remerciements.

A MADAME MADELEINE MORINIERE

Elle a guidé nos premiers contacts avec la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse, et nous a apporté sans réserve une collaboration technique dont la haute qualité est la garantie de nos résultats. Nous lui en sommes très reconnaissante et lui exprimons notre sincère amitié.

A MADEMOISELLE LE DOCTEUR E. JUSTRABO

Elle a assumé les examens anatomo-pathologiques de notre travail, donnant tout son soin à la réalisation et à l'interprétation de l'étude ultrastructurale. Qu'elle trouve ici nos vifs remerciements.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR B. MAUME

Nous le connaissons depuis peu de temps, mais avons d'emblée apprécié l'étendue de ses connaissances et la spontanéité avec laquelle il les partage. Il nous sera agréable de travailler en sa collaboration. Nous le prions de croire à notre respectueuse reconnaissance pour son accueil bienveillant.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. TRUCHOT

Nous le remercions pour l'amabilité avec laquelle il nous a ouvert l'accès du Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique de la Faculté de Pharmacie de Dijon. Avec l'expression de notre respectueux dévouement.

NOS REMERCIEMENTS VONT AUSSI

à tout le personnel du Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle en Chimie Biologique de l'Hôpital de Dijon et du Laboratoire de Biochimie Médicale de la Faculté de Médecine de Dijon,

à tous ceux qui ont contribué, de quelque manière que ce soit, à l'élaboration de cette thèse.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

Externat

Monsieur le Professeur R. PUTELAT
Monsieur le Professeur A. PIARD (in memoriam)
Monsieur le Professeur F. CABANNE
Monsieur le Professeur J. GUERRIN
Monsieur le Professeur H. VIARD
Monsieur le Professeur Agrégé S. BRIET
Monsieur le Professeur F. BARON
Monsieur le Professeur M. ALISON
Monsieur le Professeur Agrégé J.L. NIVELON
Monsieur le Professeur P. BARRY
Monsieur le Professeur Agrégé J.M. AUTISSIER
Monsieur le Professeur Cl. KLEPPING
Monsieur le Professeur Agrégé F. MARTIN
Monsieur le Professeur F. DESTAING

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

Internat

Monsieur le Professeur J. BALLIVET
Monsieur le Professeur Agrégé R. DUMAS
Monsieur le Professeur J.L. CHAPUIS
Monsieur le Professeur R. PUTELAT
Monsieur le Professeur P. CORTET
Monsieur le Professeur Agrégé G. RIFLE
Monsieur le Professeur R. MORNEX
Monsieur le Professeur Agrégé F. BERTHEZENE
Monsieur le Professeur P. PADIEU
Monsieur le Professeur J. BOUHEY
Monsieur le Professeur Agrégé P. LOUIS

P L A N

INTRODUCTION

HISTORIQUE - GENERALITES

OBSERVATION

ETUDE BIOLOGIQUE

RAPPEL CLINIQUE

RAPPEL PHYSIOLOGIQUE

I. LA STEROIDOGENESE NORMALE
II. LES INTERCONVERSIONS PERIPHERIQUES
III. LE CATABOLISME ET L'ELIMINATION URINAIRE DES STEROIDES
IV. LA REGULATION DE LA STEROIDOGENESE

ETUDE BIOLOGIQUE DES CORTICOSURRENALOMES VIRILISANTS

(Synthèse des connaissances actuelles)

I. ETUDE QUALITATIVE STATIQUE DES METABOLITES URINAIRES
II. ASPECT QUANTITATIF
III. LA STEROIDOGENESE TUMORALE
IV. ETUDE DYNAMIQUE ET ASPECTS PATHOGENIQUES

APPLICATION DES TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE ET DE CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE A L'OBSERVATION PRESENTEE

I. PRINCIPES DES ANALYSES
II. MATERIEL ET METHODES
III. RESULTATS

ETUDE IN VITRO DU MECANISME D'ACTION DE L'ACTH DANS L'OBSERVATION PRESENTEE

DISCUSSION

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Les corticosurrénalomes virilisants sont d'une relative rareté tout aussi bien dans le cadre de la pathologie médicale générale que dans celui du bilan étiologique d'un hirsutisme. Ils n'en ont pas moins intéressé les cliniciens par leur symptomatologie spectaculaire et leur polymorphisme clinique selon l'âge et le sexe du sujet atteint. Très tôt ils ont aussi été l'objet d'études biochimiques de plus en plus détaillées.

Depuis une quinzaine d'années surtout, des centaines d'articles leur ont été consacrés, qu'il s'agisse de revues générales ou de publications de cas nouveaux mettant en exergue des particularités cliniques ou biologiques.

Cette question n'a toutefois rien perdu de son actualité, car les pôles d'intérêt ont évolué, délaissant les études statistiques de données symptomatiques et les discussions diagnostiques pour tenter une approche pathogénique et pronostique à travers l'exploration biologique. C'est l'espoir que donnent les techniques perfectionnées telles que l'analyse biochimique fine des sécrétions hormonales, la microscopie électronique, la mise en culture des tissus tumoraux.

La nouvelle observation que nous présentons a bénéficié d'une telle étude biologique ; elle tire de plus son originalité du comportement biochimique associé au processus tumoral.

Nous avons eu, dans ce travail, le souci tout à la fois de faire le point des données biologiques récentes sur les corticosurrénalomes virilisants et d'apporter, grâce aux particularités de notre cas personnel, des éléments d'ordre biochimique, évolutif et physiopathologique afin d'en guider la discussion.

Le but fixé n'était donc pas de reconsidérer une étude globale de ce type d'affection. Aussi, après un bref rappel historique, les divers chapitres envisagés retraceront la démarche qui a été la nôtre :

. tout d'abord la présentation de notre observation personnelle sous ses aspects cliniques, de l'exploration fonctionnelle hormonale in vivo selon les techniques habituelles, de l'étude anatomo-pathologique, en particulier de l'observation ultrastructurale du tissu néoplasique.

. ensuite le regroupement des connaissances acquises sur les corticosurrénalomes virilisants, essentiellement dans le domaine de la stéroïdogenèse tumorale ; la confrontation de ces données avec l'observation présentée faisant ressortir les caractéristiques particulières de cette dernière, et incitant à approfondir son étude par des méthodes d'analyse plus élaborées :

1° la chromatographie gaz-liquide (CGL) et la chromatographie gaz-liquide couplée à la spectrométrie de masse (CGL-SM), méthodes d'analyse biochimique que nous avons personnellement utilisées pour l'étude des stéroïdes urinaires de la malade au Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle en Chimie Biologique, sous la direction du Professeur P. PADIEU et du Docteur R.J. BEGUE.

2° étude histochimique comportant en particulier la mise en culture des cellules surrénaliennes, permettant de préciser la régulation de leur stéroïdogenèse ; cette étude a été réalisée par l'équipe du Professeur J.M. SAEZ à l'Unité de Recherches Endocriniennes et Métaboliques chez l'enfant, INSERM, Hôpital Debrousse, Lyon.

Après cette étude biologique, les éléments marquants et surtout inhabituels de l'observation présentée seront regroupés dans une discussion générale afin de tenter d'apporter une explication ou du moins des hypothèses pour répondre aux différentes questions soulevées.

HISTORIQUE – GENERALITES

L'individualisation tant clinique que biochimique des corticosurrénalomes virilisants s'est faite par une double approche dont les deux pôles ont été reliés de façon de plus en plus précise :

- la tumeur surrénalienne, d'une part
- le syndrome clinique, plus précisément l'étude des syndromes de virilisation, d'autre part.

Nous en rappellerons les principales étapes, en nous inspirant du travail de synthèse présenté par notre Maître Paul GUINET en 1965 (76).

Dès 1809 William COOKE publiait la première observation connue de tumeur des glandes surrénales, qu'il décrivit cliniquement comme une tumeur "avec adipose et hypertrichose". Par ailleurs, à une époque bien plus lointaine, les cas de virilisation de sujets de sexe féminin avaient attiré l'attention sans que leur étiologie en ait été bien précisée : c'est le cas de l'observation de SAMPSON, en 1695, concernant "Hannah TAYLOR, a very extraordinary child of about six years of age".

Mais le mérite d'avoir établi une relation entre la tumeur surrénalienne et l'état de virilisation revient sans conteste à APERT (4) et à GALLAIS (59) : grâce à ces auteurs est individualisé le terme de "syndrome surréno-génital", GALLAIS précisant bien dans sa thèse l'étiologie non univoque du syndrome clinique de virilisation, tumeur ou hyperplasie bilatérale des surrénales. Il indique également l'espoir qu'il fondait sur des études non pas anatomo-cliniques mais biochimiques pour obtenir une classification plus précise des syndromes de masculinisation et des syndromes d'hyperproduction hormonale corticosurrénalienne.

Effectivement, les travaux biochimiques, qui seront détaillés plus loin, devaient se révéler particulièrement fructueux,

permettant non seulement la séparation des hypercorticismes androgéniques et des hypercorticismes métaboliques (maladie de Cushing) - lesquels peuvent toutefois comporter des signes cliniques de virilisation -, mais aussi le rattachement aux hypercorticismes androgéniques de tableaux de pseudo-hermaphrodisme féminin. Ces travaux devaient bien confirmer également l'individualisation des corticosurrénalomes virilisants, correspondant à l'apparition, au sein du parenchyme surrénalien, d'un tissu tumoral à pouvoir sécrétoire androgénique, par opposition aux hyperplasies diffuses bilatérales à sécrétion androgène qui correspondent à une déviation de la stéroïdogenèse par anomalie enzymatique.

Enfin est devenue parfaitement claire la notion du mode variable d'expression clinique d'une tumeur de même potentialité sécrétoire selon l'âge et le sexe du sujet, les tumeurs virilisantes ayant été individualisées de façon plus récente chez les sujets de sexe masculin, pour la raison bien évidente de leur extériorisation clinique discrète.

Ainsi en est-on arrivé à une définition des tumeurs androgéniques que nous emprunterons à Monsieur GUINET (76,77) : *"Le terme de tumeur androgénique exprime d'abord une réalité clinique, la virilisation, que celle-ci soit isolée ou seulement prédominante ; mais il implique aussi une acceptation biologique, la production en excès, mais non exclusive, d'hormones masculinisantes, phénomène essentiel, apportant la justification des symptômes dans la majorité des cas, exceptionnellement aussi latent et sans extériorisation sur les récepteurs".*

OBSERVATION

Observation N° 74.758
D... Catherine, née le 24.4.1960
Service de Médecine II (Professeur R. PUTELAT)
Hôpital du Bocage
2, avenue de Lattre de Tassigny 21034 DIJON CEDEX

RESUME

Jeune malade de 14 ans présentant un syndrome clinique de virilisation caractérisé par un hirsutisme majeur vraisemblablement apparu en période pubertaire, et par une hypertrophie clitoridienne modérée sans aménorrhée.

Profil biologique urinaire marqué par un taux peu élevé des 17 oxo-stéroïdes (18 à 30 mg/24h), une quasi-absence de DHEA, des taux élevés de 11β-hydroxy-androstérone (environ 7 mg/24h) et de prégnane-triol (11 mg/24h). Absence de modification de ces taux au cours des tests de freinage par la Dexamethasone et de stimulation par l'ACTH. Testostérone plasmatique modérément élevée (150 à 280 ng p. 100 ml), cortisolémie non abaissée, taux très élevé de 17α-hydroxyprogestérone plasmatique. ACTH plasmatique effondré.

Tumeur corticosurrénalienne gauche encapsulée de 50 grammes, diagnostiquée radiologiquement (urotomographies et angiographie). Aucun caractère de malignité lors de l'étude anatomo-pathologique (microscopie optique et microscopie électronique).

Après ablation de la tumeur, régression de l'hirsutisme et effondrement des taux de tous les stéroïdes urinaires. Evolution favorable avec un recul de 14 mois.

OBSERVATION

Catherine D... âgée de 14 ans est hospitalisée le 1° Juillet 1974 dans le Service de Médecine II par Madame le Docteur RIFLE pour bilan d'un syndrome de virilisation.

I. ANTECEDENTS HEREDITAIRES ET COLLATERAUX

La mère de la malade n'a jamais présenté aucun symptôme de masculinisation.

Par contre, une tante aurait été traitée pour un hirsutisme avec retard pubertaire (premières règles à 17 ans).

Un frère de 9 ans et une soeur de 4 ans ne présentent pas d'hirsutisme.

II. ANTECEDENTS PERSONNELS

On note seulement une naissance prématurée à l'âge de 7 mois (poids de naissance = 2,375 kg, apparemment pas de souffrance néo-natale), ainsi qu'une appendicectomie à l'âge de 10 ans.

III. ANAMNESE

Le début des troubles est difficile à préciser, l'interrogatoire fournissant des données contradictoires.

Selon la malade, l'hyperpilosité du visage aurait existé dès l'âge de 4 ans, sans notion d'un hirsutisme plus étendu ; vers 6 ans, apparaissent des poils longs et durs sur les avant-bras et les jambes. L'hirsutisme s'accentue vers l'âge de 10 ans, à la faveur, semble-t-il, de rasages intempestifs répétés. Parallèlement apparaît une pilosité pubienne et axillaire avec extension sur le dos et le ventre. La tonalité grave de la voix serait apparue progressivement à partir de l'âge de 8 ans.

Selon ses parents, l'hyperpilosité n'aurait été notée qu'à partir de 11 ans, et la voix aurait toujours été grave.

LES REGLES SONT APPARUES A 11 ANS, avec des cycles réguliers de 30 jours, une tendance à l'oligoménorrhée (durée des menstruations voisine de trois jours) et la présence de douleur prémenstruelles.

La croissance s'est déroulée régulièrement, avec semble-t-il une légère avance par rapport aux enfants de même âge ; depuis un an , soit depuis l'âge de 13 ans, la taille est stationnaire.

Il n'y a jamais eu d'administration de traitement hormonal androgénique.

IV. EXAMEN CLINIQUE

Il permet de noter :

1° Un hirsutisme caractérisé par une pilosité très developpée en dehors de la topographie féminine :

- au niveau du visage, favoris, barbe et moustache (photographie p.10)
- implantation masculine des cheveux avec golfes fronto-temporaux
- pilosité pubienne losangique se prolongeant sur la ligne blanche au delà de l'ombilic
- hypertrichose également notée dans lá région intermammaire, sur le ventre, le dos, sur les jambes, les bras et les avant-bras
- pilosité périnéale s'étendant à la face supéro-interne des cuisses et du sillon interfessier (photographie p. 10)

2° Une acné avec épaississement cutané

3° Une hypertrophie clitoridienne d'intensité moyenne : clitoris long d'environ 2 cm, la vulve étant par ailleurs normale (pas d'aspect d'intersexualité) ; l'examen gynécologique trouve un vagin normal et un utérus de petite taille.

4° Une morphologie androïde avec épaules larges, ainsi que le confirme le morphotype :

Taille = 1,48 m
Poids = 50 kg
Envergure = 1,55 m
Diamètre bi-acromial = 39 cm
Diamètre bi-trochantérien = 30,5 cm

5° Une voix grave

6° Un développement mammaire pratiquement nul

7° Une hypertrophie musculaire particulièrement nette au niveau de la ceinture scapulaire.

A ce tableau de virilisation ne s'associe apparemment aucun symptôme en faveur d'un hypercorticisme métabolique ou minéralocorticoïde :

pas d'obésité facio-cervico-tronculaire
pas de vergetures
pas d'amyotrophie quadricipitale
pas d'hypertension artérielle
pas de crampes musculaires .

La palpation soigneuse de l'abdomen et des fosses lombaires ne permet de percevoir aucune masse suspecte.

Le reste de l'examen clinique est par ailleurs normal.

V. EXAMENS PARACLINIQUES

A. Examens biologiques à l'exclusion du bilan hormonal

Il existe une polyglobulie à 5.920.000 globules rouges et 19.200 globules blancs, avec un hématocrite à 52 %, un taux d'hémoglobine à 17,2 g/l, un volume globulaire moyen à 87 $\mu 3$; une vitesse de sédimentation à 2 à la première heure ; la mesure des volumes circulants (volume sanguin total, volume globulaire relatif) est dans les limites de la normale.

Les ionogrammes sanguins et urinaires sont normaux, de même que la calcémie, la phosphorémie, la calciurie et la phosphaturie.

La tolérance glucidique est proche de la normale : glycémie à jeûn entre 1 g/l et 1,10 g/l (technicon), glycémie post-prandiale à 1,15 g/l, hyperglycémie provoquée par voie orale (reproduite page 13) montrant une glycémie à jeûn normale, des flèches d'hyperglycémie et d'insulinémie satisfaisantes avec toutefois absence d'hypoglycémie secondaire franche et de retour de l'insulinémie aux taux de base à partir de la 150° minute.

B. Examens radiologiques à l'exclusion des examens pratiqués à la recherche d'une tumeur surrénalienne

La radiographie pulmonaire est sans particularité.

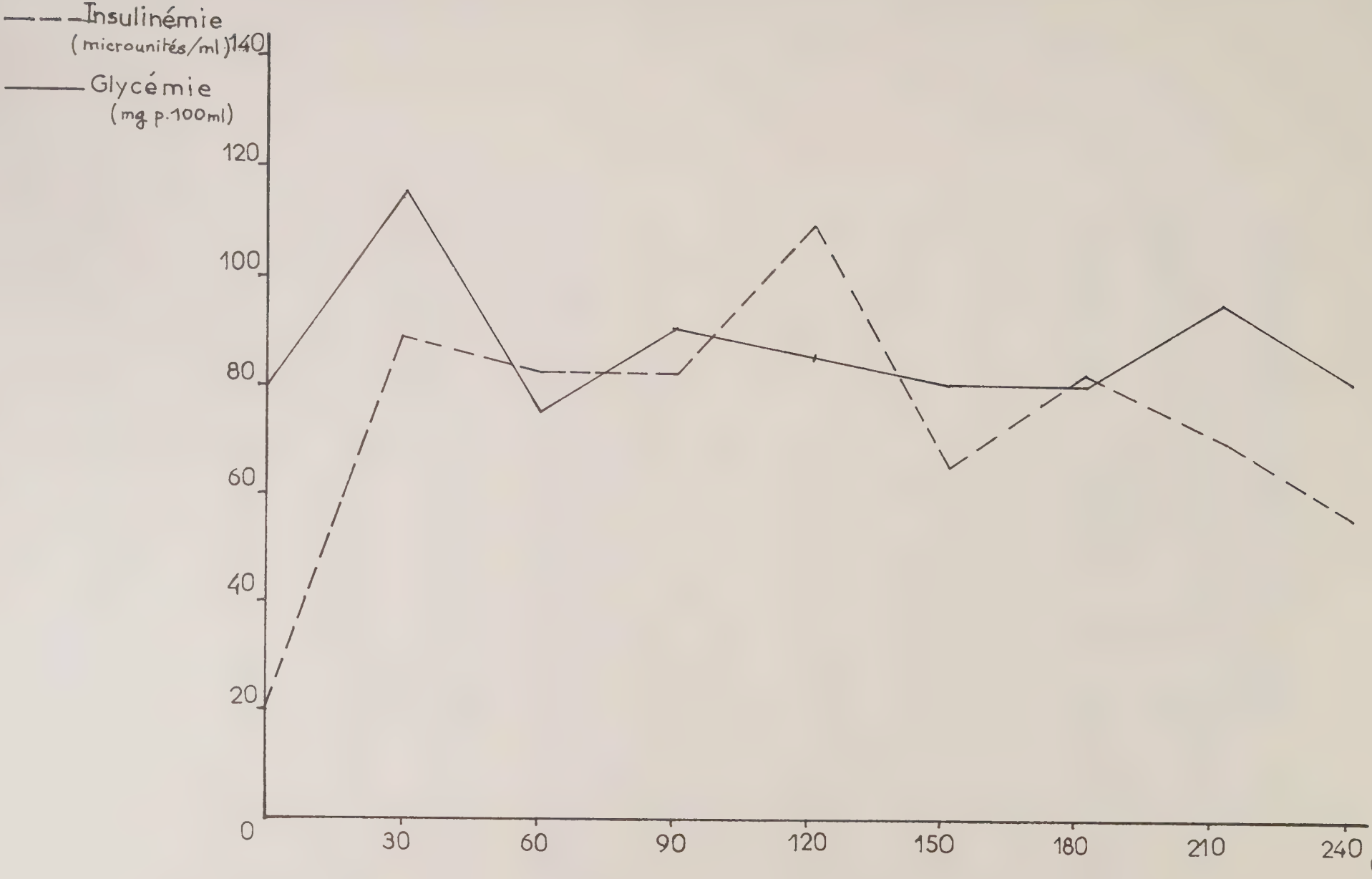
Les radiographies du squelette objectivent une trame osseuse normale, l'absence de géodes, et permettent de calculer l'âge osseux : celui-ci est évalué à 15 ans (os du coude soudés, ailes iliaques non soudées), soit une avance de 10 mois. Le sésammoïde du pouce est présent. Les radiographies du crâne montrent une petite selle turcique fermée, sans calcification de la région.

C. Le bilan hormonal

Les examens suivants sont pratiqués :

1° Un bilan gynécologique : frottis vaginaux, coelioscopie.

2° Des dosages hormonaux sur les urines de 24 heures dans les conditions de base et au cours de tests dynamiques :



HYPERGLYCEMIE PROVOQUEE PAR VOIE ORALE

(Insulinémie:dosage radio-immunologique)

(Glycémie : dosage par la méthode de la glucose-oxydase)

. 17 oxo-stéroïdes : dosage selon la méthode colorimétrique de ZIMMERMANN après hydrolyse acide

. 17 hydroxy-corticostéroïdes : dosage selon la méthode colorimétrique de PORTER et SILBER après hydrolyse enzymatique par le Suc d'Hélix Pomatia (SHP)

. chromatographie des 17 oxo-stéroïdes totaux : chromatographie en phase gazeuse après hydrolyse enzymatique des conjugués par le SHP

. estrogènes : dosage selon la méthode de KOBER après hydrolyse enzymatique des conjugués par le SHP

. prégnandiol, alloprégnandiol et prégnanetriol : dosage par chromatographie en phase gazeuse après hydrolyse des conjugués par le SHP

. cortisolémie : dosage par radio-compétition

. testostéronémie : dosage par méthode radio-immunologique.

Ces examens sont ainsi réalisés au cours des tests suivants (la date des recueils urinaires et des prélèvements sanguins étant indiquée dans les tableaux de résultats) :

. test de JAYLE comportant l'administration de 3 mg de dexaméthasone du 2.7.74 au 10.7.74 et de 5000 unités de gonadotrophines chorioniques trois jours de suite (les 7, 8, et 9.7.74)

. test de THORN avec perfusion de 25 mg d'ACTH 1-24 (Synacthène) dans 500 ml de glucosé isotonique à 5 % sur 8 heures le 26.7.74

. épreuve à la dexaméthasone (Dectancyl renforcé) à raison de 8 mg de dexaméthasone par jour les 29, 30 et 31.7.74.

Sont également effectués des dosages d'ACTH plasmatique et d'aldostéronurie dans les conditions basales (à distance de tout test dynamique).

Les résultats de l'ensemble de ce bilan hormonal sont présentés dans les pages suivantes.

FROTTIS VAGINAL (4.7.74)

L'aspect cytologique est celui d'une cervico-vaginite atrophique.

Les cellules malpighiennes sont exclusivement parabasales. Elles sont arrondies et desquament isolément en placards bien étalés. Elles subissent des altérations d'origine inflammatoire avec fausse éosinophilie cytoplasmique et dégénérescence nucléaire.

Le fond de la préparation est constitué par des nappes denses de polynucléaires altérés.

Ce frottis vaginal démontre donc l'absence totale d'incitation estrogénique.

(Dr Cl. MOTTOT)

COELIOSCOPIE (15.7.74) Dr J.F. VEYRE

L'utérus est de taille quasi-normale, les annexes sont normales. Les deux ovaires sont de petite taille, lisses, ne présentant aucune cicatrice de corps jaune ou de follicule superficiel. Biopsie de l'ovaire droit : la coque ovarienne est très dure.

(Effectivement, cette biopsie ne ramène pas de parenchyme ovarien).

PRELEVEMENTS	URINES DU 1 AU 2.7.74 SANG DU 2.7.74	URINES DU 6 AU 7.7.74 SANG DU 7.7.74	URINES DU 10 AU 11.7.74 SANG DU 11.7.74
créatininurie (g/24h)	0,76	0,86	0,70
17-oxo-stéroïdes (mg/24h)	18,00	20,41	19,14
17-hydroxycorticostéroïdes (mg/24h)	3,78	4,21	3,08
estrogènes (γ/24h)	6,00	3,90	14,30
CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES 17-OXO-STEROIDES (mg/24h)			
Androstérone	1,22	1,38	1,48
etiocholanolone	1,46	1,77	2,41
DHEA	0,39	0,51	0,51
11-oxo-androstérone			
11-oxo-étiocholanolone	1,78	2,09	1,92
11β-hydroxy-androstérone	6,95	8,32	6,32
11β-hydroxy-étiocholanolone	2,02	2,79	2,59
CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES 21-DESOXY-20-HYDROXYSTEROIDES (mg/24h)			
allo-prégnandiol	0,87	0,75	0,71
prégnandiol	1,26	1,56	1,36
prégnanetriol	11,05	10;01	8,37
cortisolémie (µg p.100 ml)	10;50	10,00	6,50
testostéronémie (ng p.100 ml)	220	285	230

PRELEVEMENTS	URINES DU 25 AU 26.7.74 SANG DU 26.7.74	URINES DU 26 AU 27.7.74 SANG DU 27.7.74	URINES DU 27 AU 28.7.74 SANG DU 28.7.74
créatininurie (g/24h)	0,75	0,90	0,55
17-oxo-stéroïdes (mg/24h)	24,20	24,60	15,20
17-hydroxycorticostéroïdes (mg/24h)	7,30	7,90	0,20
estrogènes (γ/24h)	5,50	7,50	6,90
CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES 17-OXO-STEROIDES (mg/24h)			
androstérone	1,11	1,14	0,61
étiocholanolone	1,65	1,78	0,87
DHEA			
11-oxo-androstérone			
11-oxo-étiocholanolone	1,52	1,60	0,96
11β-hydroxyandrostérone	5,58	5,80	3,45
11β-hydroxyétiocholanolone	0,98	1,04	0,63
CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES 21-DESOXY-20-HYDROXYSTEROIDES (mg/24h)			
allo-prégnandiol	1,14	1,31	0,81
prégnandiol	1,01	1,43	0,93
prégnanetriol	11,97	15,83	9,23
cortisolémie (µg p.100ml)	20,00	15,00	16,50
testostéronémie (ng p.100 ml)		120	195

PRELEVEMENTS	URINES DU 30 AU 31.7.74 SANG DU 28.7.74	URINES DU 1 AU 2.8.74 SANG DU 1.8.74
créatininurie (mg/24h)	1,06	0,86
17-oxo-stéroïdes (mg/24h)	26,60	29,30
17-hydroxycorticostéroïdes (mg/24h)	5,32	3,20
estrogènes (γ/24h)	10,00	16,00
CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES 17-OXO-STEROIDES (mg/24h)		
androstérone	1,05	1,26+
étiocholanolone	1,17	1,46+
DHEA		
11-oxo-androstérone		1,47+
11-oxo-étiocholanolone	1,24	0,67+
11β-hydroxyandrostérone		
11β-hydroxyétiocholanolone		
CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES 21-DESOXY-20-HYDROXYSTEROIDES (mg/24h)		
allo-prégnandiol		
prégnandiol	1,71	1,92
prégnanetriol	13,23	14,60
cortisolémie (µg p.100 ml)	16,50	15,00
testostéronémie (ng p.100 ml)	195 (le 30.7.74)	205

+ Ces 4 valeurs correspondent aux résultats de notre étude par CGL, ces dosages n'ayant pu être effectués par chromatographie gazeuse pour des raisons techniques.

ACTH PLASMATIQUE (23.7.74)

Inférieur à 10 pg/ml

(Méthode radio-immunologique, Dr Ch. OLIVER, Laboratoire de la Clinique Endocrinologique, groupe hospitalier de la Timone, Centre Hospitalier Régional de Marseille)

TETRAHYDROALDOSTERONURIE

28,8 µg/24h le 16.7.74
27 µg/24h le 17.7.74

Résultats normaux : 5 à 19 µg/24h

(Méthode radio-immunologique, Pr A. REVOL, Laboratoire de Biologie, Hôpital Sainte-Eugénie, Hospices Civils de Lyon)

D. Les examens radiologiques à la recherche d'une tumeur surrénalienne

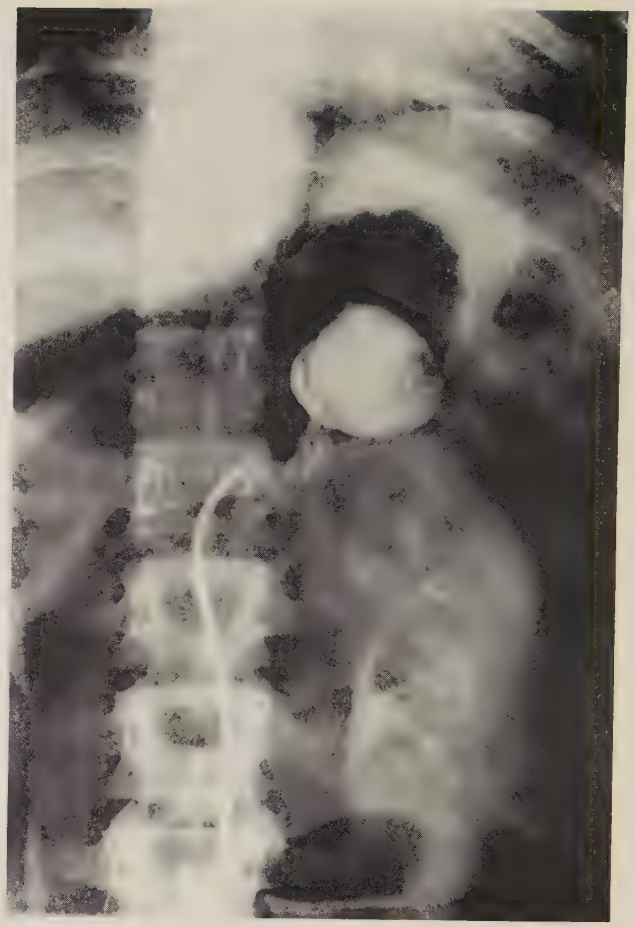
Les radiographies de l'abdomen sans préparation ne montrent pas de masse supra-rénale suspecte, pas de refoulement d'un rein.

Les tomographies sans préparation de la région permettent de suspecter une masse supra-rénale gauche.

L'urographie intra-veineuse fournit les conclusions suivantes : la sécrétion rénale est normale et symétrique ; le rein gauche est abaissé par une grosse surrénale arrondie qui coiffe son pôle supérieur (bien visible surtout sur les urotomographies). La surrénale droite n'est pas visible.

Une angiographie est alors effectuée ; les deux clichés les plus représentatifs de l'injection de l'artère moyenne surrénalienne gauche sont présentés page 21.Le compte-rendu de cet examen est donné page 22.

1.



2.

ANGIOGRAPHIE SELECTIVE DE L'ARTERE SURRENALIENNE MOYENNE GAUCHE

1. Temps artériel
2. Temps parenchymateux : image objectivant la présence d'une capsule

COMPTE-RENDU DE L'ANGIOGRAPHIE

(Pr J.P. MABILLE)

L'angiographie a consisté à pratiquer les temps suivants : aortographie abdominale globale, artériographie rénale sélective gauche, artériographie surrénalienne moyenne gauche, et mésentérique supérieure (cette injection a été faite alors que l'on pensait opacifier le tronc coeliaque).

Ces différents temps confirment la présence d'une tumeur supra-rénale gauche arrondie, mesurant 3,5 cm de diamètre environ.

Sa vascularisation est assurée essentiellement par les pédicules surrénaliens moyens dont le calibre est nettement augmenté.

Sa vascularisation est très riche et le temps parenchymateux montre son caractère relativement homogène. La tumeur est entourée d'une capsule sous laquelle, à sa partie inféro-interne, a fusé un peu de produit de contraste injecté sous trop forte pression.

Le drainage veineux s'effectue dans des délais normaux et montre mal la veine capsulaire principale.

E. Le bilan génétique

(Madame le Dr C. TURC, Laboratoire de Cytogénétique du Centre Hospitalier Régional de Dijon)

Ce bilan est normal :

. Sexe chromatinien positif : sur 400 cellules étudiées, 15 % présentent un corpuscule de Barr.

. Caryotype sur lymphocytes du sang périphérique : 46,XX

L'ensemble de ces résultats, que nous commenterons plus loin dans le détail, affirme l'existence d'une tumeur surrénalienne gauche dont le profil biologique n'est pas classique en raison de la prédominance, parmi les métabolites urinaires, de la 11 β-hydroxy-androstérone et du prégnanetriol et non de la DHEA ; par contre, l'absence de modification de ces anomalies au cours des tests de freinage et de stimulation s'inscrit bien dans le cadre d'un processus tumoral.

L'intervention chirurgicale est décidée, précédée d'un bilan pré-opératoire immédiat au cours duquel on effectue :

. un nouveau dosage d'ACTH plasmatique

. un dosage de la 17 α-HYDROXY-PROGESTERONE plasmatique

. un nouveau test de THORN (perfusion d'ACTH le 6.9.74).

Les résultats en sont donnés page 24.

TEST DE THORN

PRELEVEMENTS	URINES DU 5 AU 6.9.74 SANG DU 5.9.74	SANG DU 6.9.74	URINES DU 6 AU 7.9.74 SANG DU 7.9.74	URINES DU 7 AU 8.9.74 SANG DU 8.9.74
créatininurie (g/24h)	0,62	ACTH plasmatique : (1) 60 pg/ml	0,70	0,54
17-oxo-stéroïdes (mg/24h)	11,50	17α-hydroxyprogestérone plasmatique : (2) 2642 ng p.100 ml	15,80	10,55
17-hydroxystéroïdes (mg/24h)	4,35		3,55	4,20
cortisolémie (µg p.100 ml)	15,50	testostérone plasmatique : (3) 112 ng p.100 ml	13,00	13,50
testostéronémie (ng p.100 ml)	273		205	260
aldostéronurie (µg/24h) (dosage radio-immunologique)	11,65			

Les dosages sanguins du 6.9.74 ont été effectués au laboratoire du Pr J. BERTRAND (Hôpital Debrousse,LYON)

(1) Méthode radio-immunologique (Amersham) ; valeurs normales, à 9h du matin , au repos : inférieures à 100 pg/ml

(2) Méthode radio-immunologique ; valeurs normales chez la femme : 41 ± 14 en phase folliculaire, 176 ± 36 en phase lutéale

(3) Méthode radio-immunologique ; valeurs normales chez la femme adulte : 25 à 51 ng p.100 ml

VI. INTERVENTION CHIRURGICALE

Elle est effectuée le 9 Septembre 1974 par Monsieur le Professeur H. VIARD (Service de Clinique Chirurgicale, Hôpital du Bocage, Dijon).

Compte-rendu opératoire :

Laparotomie médiane en dépassant l'ombilic vers le bas.

1° Décollement du mésogastre postérieur en incisant le péritoine à la jonction du diaphragme et du péritoine pariétal postérieur pour décoller la totalité de la rate et de la queue du pancréas. On découvre très facilement la tumeur à l'endroit prévu, tumeur surrénalienne gauche d'environ 4 cm x 4 cm. On passe en sous-mésocolique pour découvrir la veine surrénale gauche qui est cathétérisée de façon à faire un prélèvement sanguin sélectif dans cette veine. Après ce prélèvement, section de la veine entre deux ligatures. On repasse à l'étage sus-mésocolique pour disséquer et libérer la tumeur surrénalienne. On contrôle avec des clips de nombreux petits rameaux artériels et veineux, et l'on enléve sans trop de difficulté cette tumeur qui est immédiatement confiée à Madame le Docteur RIFLE pour divers prélèvements.

2° Abord de la surrénale droite. On récline le foie vers le haut en sectionnant entre deux ligatures une veine sus-hépatique accessoire. On libère le bord droit de la veine cave et l'on tombe sur une surrénale droite tout à fait normale. La direction de la veine surrénalienne ne se prête pas à son cathétérisme pour prélèvement sanguin. Aussi se contente-t-on de faire une biopsie de la surrénale droite sur clip.

3° Exploration des ovaires qui sont blanc nacré, évoquant des ovaires de Stein-Leventhal. On réalise une biopsie au niveau de l'ovaire gauche. Suture de cette biopsie par des

points séparés de catgut.

Mise en place de drainsde Redon dans les deux loges surrénaliennes. Fermeture de la paroi au mersilène perdu.

Le protocole anesthésique n'a pas comporté l'administration de cortisone ; l'intervention s'est déroulée sans chute tensionnelle.

Ainsi, divers prélèvements ont été réalisés en cours d'intervention :

1° Des échantillons de sang de la veine efférente surrénalienne gauche, en vue de dosages hormonaux ; ceux-ci n'ont malheureusement pu être effectués, en dehors d'un dosage de cortisol (par la méthode de radio-compétition : 230 µg p.100ml).

2° La tumeur a été divisée en plusieurs fragments destinés à diverses analyses :

. étude en microscopie optique et électronique

. mise en culture en vue d'étudier le caryotype tumoral (Mme le Dr TURC) qui s'est soldée par un échec, la culture ayant été rapidement envahie par les fibroblastes.

. mise en culture en vue de préciser la stéroïdogenèse tumorale (Monsieur le Professeur B. MAUME, Laboratoire de Biochimie des Interactions cellulaires, Faculté des Sciences de la Vie et de l'Environnement, Dijon). Là encore, échec de la culture par lyse cellulaire en 48 heures.

. mise en culture pour l'étude du mécanisme d'action de de l'ACTH (Pr J.M. SAEZ) ; cette culture a pu être maintenue en survie jusqu'au 25.9.74, soit 16 jours.

. congélation de tissu tumoral pour analyse des stéroïdes (non encore effectuée).

3° La biopsie surrénalienne droite a été également congelée en vue d'une analyse de son contenu hormonal (non encore effectuée).

4° La biopsie ovarienne gauche a été étudiée en microscopie optique.

VII. ETUDE ANATOMO-PATHOLOGIQUE

A. Examen de la tumeur surrénalienne gauche

1° Examen macroscopique

La tumeur surrénalienne gauche apparaît grossièrement sphérique et mesure 4 cm de diamètre. Son poids exact n'a pu être défini, de nombreux fragments de tumeur ayant été prélevés de façon aseptique en salle d'opération. Elle est délimitée par une fine capsule congestive.

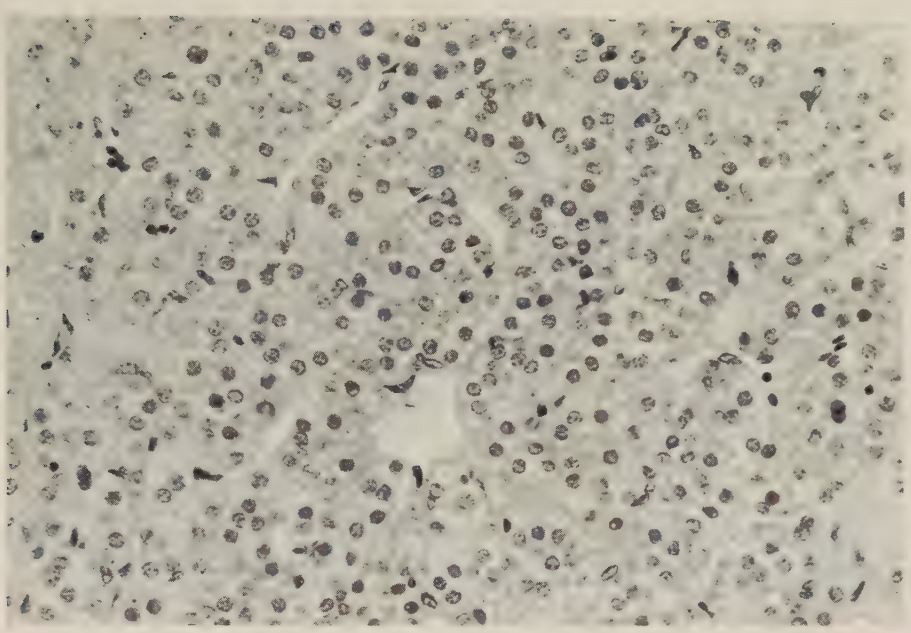
A la coupe, elle apparaît constituée par un tissu brunâtre, homogène, légèrement grenu. Son pôle inférieur est coiffé par une languette résiduelle de parenchyme corticosurrénalien.

2° Examen microscopique (microscopie optique)

a) LA TUMEUR : (Photographies page 28)

Il s'agit d'un adénome corticosurrénalien.

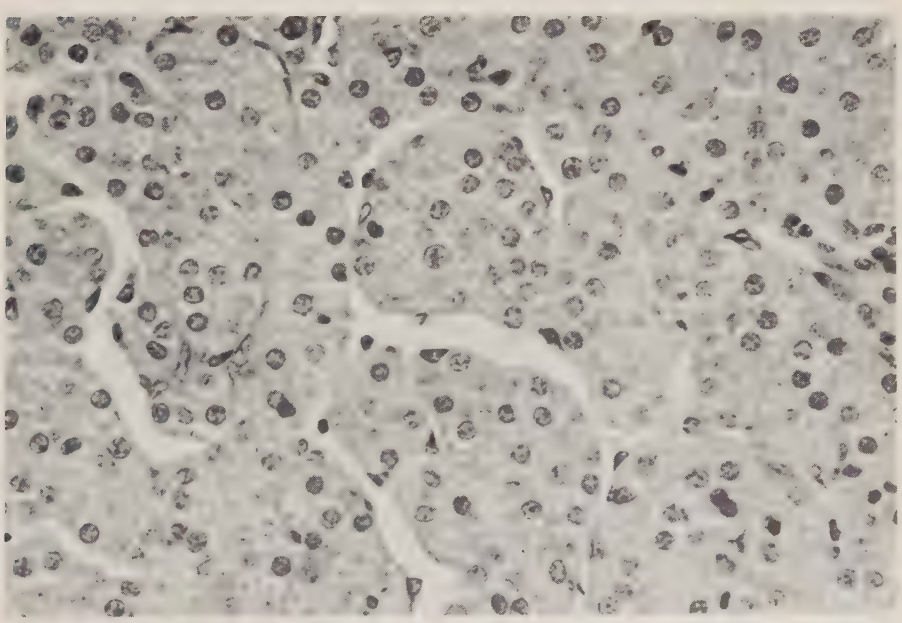
La néoformation ainsi définie est limitée en périphérie par une fine capsule scléro-hyaline bien colorée par le trichrome de Masson. Elle est faite d'une prolifération de cellules quadrangulaires aux limites cytoplasmiques nettes. Ces cellules au noyau arrondi, régulier, sont le siège d'une infiltration lipidique très marquée, qui apparaît nettement après coloration par le SoudanIII.



Microscopie optique : Gr x 250

Sur ces deux photographies, on voit que les cellules tumorales, non dystrophiques, se groupent en lobules ou en cordons le long de nombreuses fentes vasculaires (Examen X 6963, Trichrome de Masson).

Microscopie optique : Gr x 300



De plus, elles renferment quelques fines granulations PAS positives.

De tels éléments se disposent en cordons, qui longent la lumière d'assez nombreux capillaires sanguins.

Aucun stigmate histologique et cytologique de malignit& n'a été aperçu.

b) LA GLANDE SURRENALE GAUCHE

Le parenchyme surrénalien est de structure histologique normale.

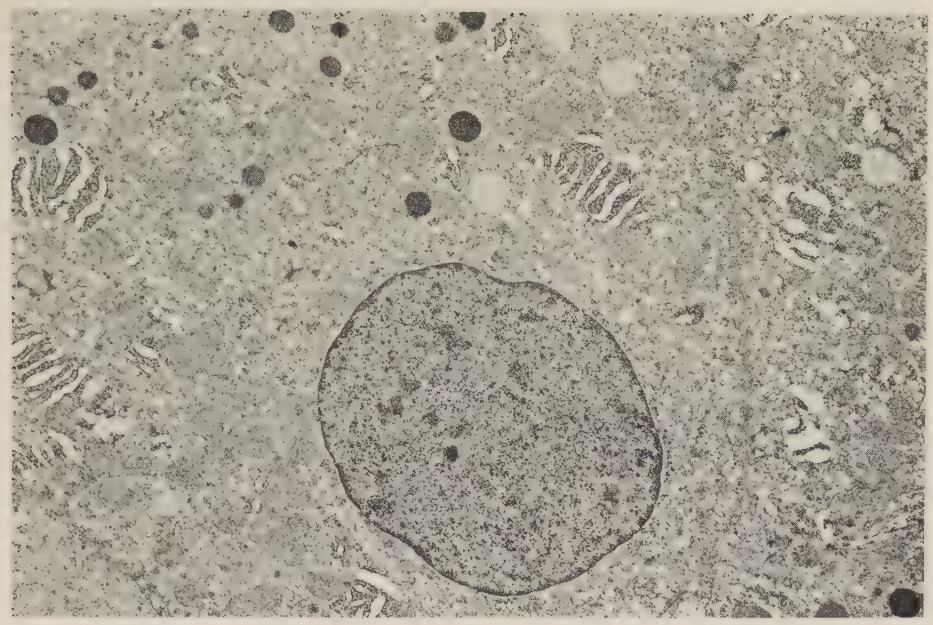
EXAMEN N° X 6963 (Mlle le Dr E. JUSTRABO)

3° Etude ultra-structurale

(Photographies page 30).

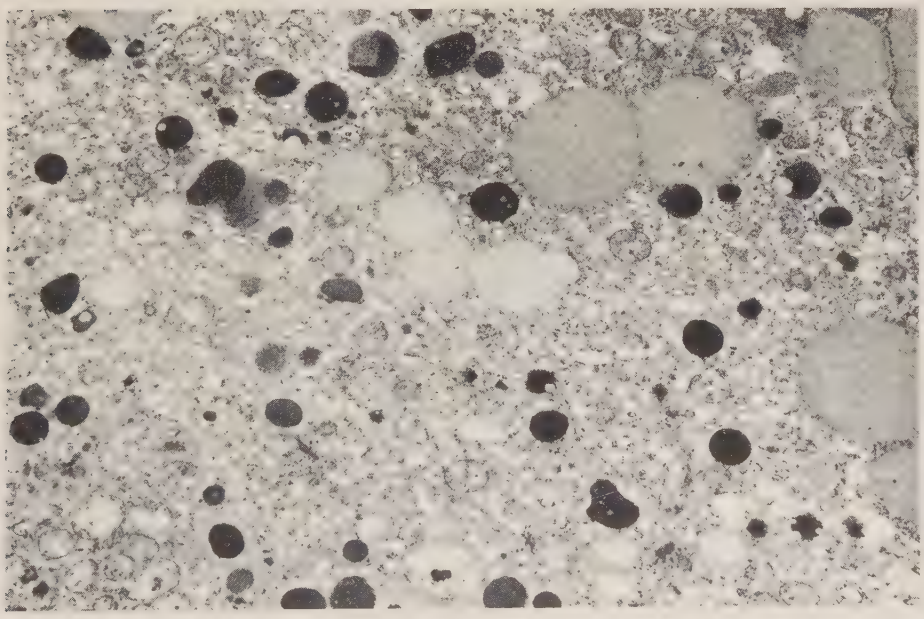
Un fragment de la tumeur surrénalienne gauche a été débité en petits cubes de 1 mm^3 fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 4 % dans du tampon cecodylate, puis post-fixés dans de l'acide osmique à 2 %. Les coupes ultra-fines ont été constrastées selon la technique de Reynolds et examinées dans un microscope Hitachi-7-S.

Leur examen fait découvrir une prolifération tumorale très orthoplasique. Cette dernière est faite de cellules régulières arrondies ou quadrangulaires. De telles cellules sont centrées par un noyau régulier à hétérochromatine peu abondante. Le noyau, rarement mitotique, est entouré par un cytoplasme pauvre en ribosomes mais riche en réticulum endoplasmique lisse. Un tel réticulum est constitué par de multiples vésicules pressées les unes contre les autres. Il entoure de rares citernes ergastoplasmiques parfois groupées en piles, et des complexes golgiens peu développés. En certains points, il encercle des ilôts de mitochondries de type tubulaire. En d'autres, il se presse au contact d'inclusions. Ces dernières ont une morphologie variable. Elles apparaissent sous la forme de petits lysosomes ou bien de grands liposomes faits d'un matériel très faiblement osmiophile,



ASPECT EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE
D'UNE CELLULE DE L'ADENOME SURRENALIEN :

Elle présente un noyau central à hétérochromatine peu abondante, un cytoplasme riche en réticulum endoplasmique lisse ; les vésicules de ce dernier se disposent autour de rares citernes ergastoplasmiques, de mitochondries tubulaires et de granulations osmiques. Gr x 4500.



MICROSCOPIE ELECTRONIQUE : Gr x 5100

On voit ici que les vésicules du réticulum endoplasmique lisse sont accompagnées par des inclusions de densité électronique variable et par quelques rares formations lysosomiales.

circonscrits par une fine membrane. Ou bien encore, ces inclusions s'identifient à de gros grains de densité électronique élevée. De tels grains, noirs ou gris foncé, sont parfois entourés par une membrane limitante. L'ensemble de ces inclusions correspond vraisemblement à une forme de stockage du cholestérol et d'autres lipides qui servent de précurseurs à la synthèse d'hormones stéroïdes dont il est impossible de préciser la nature exacte.

Cette prolifération tumorale adopte une disposition massive ou cordonale. Elle est très richement vascularisée par de multiples capillaires ou artérioles sanguins. Ces vaisseaux ne sont jamais comblés par des embols. Par ailleurs, une résille collagénique très grêle, englobant quelques fibroblastes, encercle ces structures.

Un tel aspect est donc en faveur du diagnostic d'ADENOME CORTICOSURRENALIEN, qui avait déjà été proposé après l'analyse en microscopie optique. Par ailleurs, cette analyse ultrastructurale ne permet nullement d'évoquer un déficit enzymatique.

EXAMEN N° X 6963 (Mlle le Dr E. JUSTRABO)

B. Etude histo-pathologiqe de la biopsie ovarienne gauche

La région sous-corticale de l'ovaire apparaît discrètement fibrosée. Elle renferme de très nombreux follicules primordiaux quiescents et trois kystes folliculiniques. L'un de ces kystes folliculiniques est bordé par une thèque interne subissant une métaplasie progestative modérée.

EXAMEN N° X 6963 (M. le Dr J.F. KNOPF)

VIII. EVOLUTION POST-OPERATOIRE IMMEDIATE

Les suites immédiates n'ont été marquées par aucune complication. Il faut signaler toutefois que la réanimation post-opératoire a comporté l'administration d'acétate de désoxycorticostérone (Syncortyl) et d'Hydrocortisone à titre préventif, malgré l'absence de toute chute tensionnelle, selon le schéma suivant :

- le jour de l'intervention, soit le 9.9.74, 10 mg de Syncortyl à 13 heures ; 25 mg d'hydrocortisone à 13h45, 15h45 et 20 h.
- le 10.9.74, 25 mg d'hydrocortisone à 2h, 8h, 11h et 21h ; sous perfusion de sérum glucosé hypertonique à 10 % la glycosurie était de 7,5 g/l à 19h.
- le 11.9.74, administration de 25 mg d'hydrocortisone à 2h, puis arrêt des injections d'hydrocortisone, la glycosurie de 7h étant à 50 g/l.
- le 12.9.74, retour à une glycosurie nulle.

Sur le plan hormonal, divers examens sont pratiqués dans les jours qui suivent l'intervention.

La diurèse du 16 au 17.9.74 (soit 5 jours après la dernière injection d'hydrocortisone) présente un profil hormonal caractérisé par l'effondrement des métabolites urinaires :

diurèse = 800 ml
créatininurie = 0,72 g/24h
17 oxo-stéroïdes = 0,08 mg/24h
17 hydroxy-corticostéroïdes = traces
estrogènes totaux = 9 γ/24h
taux non décelables d'androstérone, d'étiocholanolone, de DHEA, de 11 oxo-androstérone, de 11 oxo-étiocholanolone, de 11 β-hydroxyandrostérone, de 11 β-hydroxy-étiocholanolone
alloprégnandiol : non décelable

prégnandiol : 0,07 mg/24h

prégnanetriol : 0,25 mg/24h

testostéronurie : 7 µg/24h

Les autres examens pratiqués sont les suivants :

testostéronémie (20.9.74) :35 ng p. 100 ml

cortisolémie (21.9.74) : 3 µg p. 100 ml

le 30.9.74 : 17 oxostéroïdes à 0,40 mg/24h, 17-hydroxycorticostéroïdes à l'état de traces, pour une créatininurie à 0,45 g/24h

ACTH plasmatique (1.10.74) : inférieur à 5 pg/ml (Dr Ch. OLIVER, Marseille)

test au Synacthère court : cortisolémie de base à 3 µg p.100 ml, montant à 7,5 µg p.100 ml 30 minutes après l'injectionI.M.

le 7.10.74, l'épreuve de diurèse provoquée (test de Robinson-Képler) est physiologique : élimination de 72,5 % de l'eau ingérée sur 4 heures.

la glycémie est normale : 0,90 g/l (technicon)

L'ensemble de ces résultats évoque une inertie corticotrope, et la malade quitte le Service le 9 octobre 1974 avec un traitement par le Synacthène Retard (une injection I.M. de 0,5 unités par semaine).

IX. EVOLUTION ULTERIEURE

La malade est revue en consultation par Madame le Docteur RIFLE le 24 Octobre 1974 : son état est satisfaisant, elle est bien réglée ; on ne note pas de pigmentation, la tension artérielle est à 12/7, mais en raison d'une asthénie le traitement par le Synacthène est remplacé par 5 mg d'hydrocortisone per os un jour sur deux.

Un court bilan est réalisé au mois de Novembre, montrant les résultats suivants (traitement = 10 mg de cortisone par jour) :

poids = 39 kg pour une taille de 150,5 cm, soit semble-t-il une augmentation de 2,5 cm de la taille

diurèse provoquée = 80 %

ionogrammes sanguins et urinaires normaux

glycémie = 1 g/l avec glycosurie nulle.

En ce qui concerne le bilan stéroïdien :

créatininurie = 0,40 g/24h

17 oxo-stéroïdes = 0,95 mg/24h

17 hydroxycorticostéroïdes = 1,10 mg/24h

prégnandiol, prégnanetriol et estrogènes indosables.

Signalons par ailleurs la disparition de la polyglobulie : chiffre de globules rouges constamment inférieur à 4.300.000/mm^3, 8500 globules blancs/ mm^3, V.S. à 8 - 21.

Enfin, les règles sont normales, l'hirsutisme paraît s'atténuer, il existe même une dépilation spontanée. La peau redevient fine. On poursuit le traitement par 10 mg d'hydrocortisone.

L'hydrocortisone sera ainsi poursuivie à la même dose jusqu'en août 1975, date à laquelle un nouveau bilan est effectué après trois jours d'arrêt du traitement :

diurèse provoquée = 100 %

profil hormonal :

créatininurie = 0,75 g/24h

17 oxo-stéroïdes = 1,70 mg/24h

17 hydroxycorticostéroïdes = 1,60 mg/24h

estrogènes totaux : 17 γ/24h

androstérone = 0,30 mg/24h

étiocholanolone = 0,20 mg/24h

DHEA et 11 oxo-androstérone indosables

11 oxo-étiocholanolone = 0,20 mg/24h

11β-hydroxy-androstérone et 11β-hydroxy-étiocholanolone indosables

alloprégandiol indosable

prégnandiol = 0,15 mg/24h
prégnanetriol = 0,25 mg/24h.

Jusqu'en Novembre 1975, le traitement par l'hydrocortisone est suivi de manière très fantaisiste, puis la malade est perdue de vue.

X. COMMENTAIRES

Ils seront brefs, réduits à la mise en valeur des caractéristiques assez surprenantes de cette observation de tumeur surrénalienne virilisante.

1° Sur le plan clinique, l'hirsutisme, d'intensité majeure, était dominant, sinon exclusif ; il existait une hypertrophie clitoridienne avec d'autres signes de masculinisation, mais modérés. Surtout, il n'y avait pas d'aménorrhée alors même que les frottis vaginaux évoquaient la carence en estrogènes et que la coelioscopie ne retrouvait pas de séquelles d'ovulation ; toutefois, la biopsie ovarienne était compatible avec la survenue d'ovulations.

2° Il s'agissait d'un tableau caractérisé par la sécrétion exclusive des produits de la série androgène : il n'y avait aucun signe, tant clinique que biologique, d'hypercortisolisme ou d'hyperaldostéronisme.

3° Les examens paracliniques firent ressortir un double contraste :

a) contraste entre les aspects statiques et dynamique des sécrétions : des stéroïdes urinaires ; le profil de base n'était absolument pas caractéristique d'une tumeur androgénosécrétante, mais évoquait bien davantage un déficit enzymatique

en 21-hydroxylase du fait de l'augmentation marquée des taux de prégnanetriol, ce que vint confirmer le dosage de 17 α-hydroxy-progestérone plasmatique. Cet aspect statique pouvait donc faire émettre sans difficulté le diagnostic d'hyperplasie surrénale congénitale à révélation tardive.

A l'opposé, l'aspect dynamique était celui d'une tumeur sécrétant autonome ne se laissant pas influencer par les tests de freinage et de stimulation. Un élément de plus était représenté par l'effondrement des taux plasmatiques d'ACTH, même si les techniques utilisées ne permettaient pas d'accorder à ce dosage une fiabilité absolue.

b) contraste entre ces caractéristiques d'autonomie sécrétoire, évocatrices de la malignité, et l'absence de tout critère, tant anatomo-pathologique qu'évolutif, en sa faveur.

En conclusion, on se trouvait en présence d'une TUMEUR BENIGNE RADIOLOGIQUEMENT et HISTOLOGIQUEMENT, ayant une TOTALE AUTONOMIE SECRETOIRE, et modulant sa SECRETION ANDROGENIQUE comme l'aurait fair uneHYPERPLASIE par DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE, en remarquant que ce déficit paraissait à première vue réel et non purement secondaire à l'inflation hormonale, puique les taux hormonaux globaux étaient modérément augmentés.

4° Quelques remarques s'imposent enfin sur des points de détail :

- l'injection de gonadotrophines chorioniques n'augmentait ni les 17 oxo-stéroïdes, ni la testostérone plasmatique.

- un dosage difficile à interpréter était le chiffre particulièrement bas (0,20 mg/24h) des 17-hydroxy-corticostéroïdes lors du premier test de THORN, le lendemain de la perfusion d'ACTH ; même en tenant compte de la baisse globale de toutes les sécrétions hormonales de cette période de 24 heures, ce résultat, bien que vérifié, semble devoir ne pas

être pris en compte, d'autant que la cortisolémie est restée stable.

- la cortisolémie et les 17-hydroxycorticostéroïdes n'augmentaient pas lors des deux perfusions d'ACTH ; ce fait pourrait traduire un déficit partiel en amont ; l'insuffisance de l'activité 21-hydroxylase peut l'expliquer, mais il aurait évidemment été intéressant de doser le composé S voire même d'effectuer un test à la métopirone pour explorer l'activité 11 β-hydroxylase. Quoiqu'il en soit, dans la période post-opératoire marquée par une inertie corticotrope, l'administration de Synacthène a fait largement doubler la cortisolémie : la non-réponse antérieure semblait donc s'être effacée, elle serait liée au processus tumoral, non obligatoirement d'ailleurs par le biais d'un déficit enzymatique puisque, avant l'ablation de la tumeur, l'ACTH n'augmentait pas la testostéronémie (sécrétion ne faisant intervenir ni la 21- ni la 11β-hydroxylase).

- quant à l'étude ultrastructurale, elle affirma qu'il s'agissait d'une formation endocrinienne probablement bénigne dont la sécrétion était celle de stéroïdes, probablement d'androgènes, mais ne fournit aucun argument spécifique en faveur d'un déficit enzymatique.

ETUDE BIOLOGIQUE

Dans la mesure où les données biologiques débouchent sur une confrontation avec les éléments cliniques, nous présenterons tout d'abord un rappel des symptômes les plus caractéristiques des tumeurs corticosurrénaliennes virilisantes.

Par ailleurs, la compréhension des aspects biologiques de ces tumeurs nécessite le rappel de données physiologiques : stéroïdogenèse normale, interconversions périphériques et phénomènes cataboliques auxquels sont soumises les hormones corticosurrénaliennes. L'étude de la régulation de la stéroïdogenèse sera plus particulièrement détaillée ; en effet, elle constitue la base actuelle de discussion de la pathogénie des tumeurs corticosurrénaliennes, qui sera développée plus loin.

Après ce double rappel clinique et physiologique, nous présenterons une vue synthétique des données biologiques actuellement connues des corticosurrénalomes virilisants. De cette étude d'ensemble se dégage tout l'intérêt des méthodes biochimiques et histochimiques utilisées. Les principes et les résultats de l'application de ces méthodes à l'observation présentée ci-dessus constitueront la dernière partie de ce chapître biologique.

RAPPEL CLINIQUE

Dans le chapitre de généralités, l'accent a été mis sur l'expression variable, selon le sujet, d'une tumeur androgéno-sécrétante. Nous présenterons successivement ici les divers aspects symptomatiques des CORTICOSURRENALOMES VIRILISANTS A REVELATION POST-PUBERTAIRE CHEZ DES SUJETS DE SEXE FEMININ, puisque notre observation se situe dans ce cadre.

Par contre, cette restriction ne sera plus appliquée lors de l'étude biologique de ces tumeurs, qui sera présentée sans établir de relation avec leur mode d'expression selon l'âge ou le sexe.

Pour éclairer davantage les éléments de discussion qui seront soulevés par notre observation, il est utile d'insister sur certaines formes symptomatiques cliniques ou biologiques des corticosurrénalomes virilisants, qui mettent en lumière l'absence de parallélisme formel entre la nature tant qualitative que quantitative des androgènes sécrétés, d'une part, des signes cliniques, d'autre part.

A l'opposé, certains aspects bien connus seront délibérément passés sous silence, pour ne pas surcharger cette étude, à savoir :

- les problèmes de diagnostic positif, essentiellement représentés par la discussion des avantages des différentes méthodes paracliniques de mise en évidence de la tumeur, que nous ne ferons que citer.

- la description anatomo-pathologique (seuls les aspects ayant valeur de critère évolutif seront évoqués et discutés à la fin de notre travail).

- les modalités thérapeutiques.

le diagnostic différentiel avec les autres hyperandrogénies (hirsutisme essentiel, hyperandrogénies ovariennes ou iatrogènes) ; le problème de l'élimination des autres hyperproductions androgéniques surrénaliennes, et principalement de l'hyperplasie congénitale des surrénales par déficit en 21-hydroxylase, sera évoqué dans le chapitre de discussion, puisqu'il se pose de façon plus aiguë dans le cas rapporté ici.

Les tumeurs corticosurrénaliennes virilisantes comportent habituellement l'association, à des degrés divers, d'un syndrome endocrinien et d'un syndrome tumoral.

I. LE SYNDROME ENDOCRINIEN

Il est représenté par une masculinisation avec régression des caractères féminins.

Une triade symptomatique le caractérise :

1° Un hirsutisme , c'est-à-dire une hyperpilosité débordant le territoire féminin. La description donnée plus haut est à cet égard tout à fait caractéristique.

2° Une aménorrhée , d'apparition en général plus tardive, parfois 4 à 6 ans après les premiers signes pileux. Elle est anovulatoire, associée à des taux de FSH normaux ou bas, à un frottis vaginal de type intermédiaire ou androgénique,et à une involution ovarienne décelable par coelioscopie.

3° Une hypertrophie clitoridienne plus ou moins marquée.

D'autres signes d'imprégnation androgénique sont rencontrés, en particulier une acné, une raucité de la voix, une atrophie mammaire sans dépigmentation aréolaire, un développement de la musculature...

II. LE SYNDROME TUMORAL

La tumeur est de volume variable, avec un poids allant de quelques dizaines de grammes au voisinage du kilogramme.

La détection clinique est évidemment possible à partir d'un certain volume par la palpation des hypochondres et des fosses lombaires. Parfois même la malade vient consulter pour une sensation de pesanteur de la région.

L'existence de la tumeur sera confirmée ou cherchée par les examens complémentaires :

- radiographies de l'abdomen sans préparation, montrant un refoulement du rein, voire des images aériques du colon.

- urographie intra-veineuse avec tomographies, examen moins pénible que le rétro-pneumo-péritoine.

- artériographie (aortographie par la méthode de Sedlinger + artériographie sélective rénale et si possible surrénalienne).

- cavographie, qui s'associera à des prélèvements sanguins au plus près des veines efférentes surrénaliennes, pour dosage des stéroïdes sécrétés par la tumeur.

Outre l'affirmation et la localisation de la tumeur, ces examens radiologiques sont indispensables pour dépister les formes bilatérales, notion sur laquelle ont insisté GUINET, PUTELAT et BETHOUX (71,74) en 1958 et 1959, en admettant qu'il est très difficile de différencier une localisation bilatérale

d'emblée d'une métastase contro-latérale.

Enfin, des métastases à distance peuvent accompagner la tumeur primitive, affirmant alors sa malignité : métastases pulmonaires et hépatiquesen particulier.

III. FORMES CLINIQUES RESULTANT DE L'ASSOCIATION DE CES DEUX SYNDROMES

Syndrome endocrinien et syndrome tumoral vont, d'un cas à l'autre, comporter des symptômes de nature et d'intensité variables, et avoir chacun une part plus ou moins prépondérante, avec les deux extrêmes :

A. SYNDROME ENDOCRINIEN CLINIQUEMENT MAJEUR , biologiquement confirmé, sans tumeur évidente cliniquement ou radiologiquement

B. SYNDROME TUMORAL PRATIQUEMENT ISOLE : il s'agit des corticosurrénalomes sans syndrome endocrinien, qui posent également de délicats problèmes diagnostiques ; toutefois, en dehors de la survenue d'un corticosurrénalome masculinisant chez l'homme, ou d'un corticosurrénalome féminisant chez la femme, qui passent cliniquement inaperçus, les corticosurrénalomes sans aucun signe de virilisation chez la femme apparaissent tout à fait exceptionnels.

Les observations les plus anciennes (141,148,174) font exclusivement mention de l'absence de syndrome surrénogénital clinique, mais ne comportent aucune étude biologique.

Ailleurs, la nature de la tumeur n'étant pas connue avant l'intervention, les dosages hormonaus n'ont pas été pratiqués. Il semble donc plus raisonnable de parler de corticosurrénalomes "muets" ou latents, avec deux possibilités :

- absence de traduction clinique mais anomalies biologiques mineures (au maximum production faible d'hormones androgéniques par la tumeur, n'ayant aucune répercussion au niveau des dosages urinaires).

- la production prédominante par la tumeur d'androgènes de faible pouvoir virilisant (à fonction cétonique en 17) qui ne seraient pas transformés en androgènes forts par les processus d'interconversion périphérique est peu vraisemblable.

- il peut s'agir d'un trouble de la réceptivité tissulaire (inefficacité des androgènes au niveau des tissus cibles), comme cela a été démontré récemment : dans un cas d'hyperplasie surrénale congénitale par déficit en 21-hydroxylase ne comportant pas de signe de virilisation et ayant laissé évoluer deux grossesses à terme, malgré un tableau biologique typique, LEICHTER et JACOBS (110) ont trouvé une diminution de la capacité de liaison de la testostérone (démontrée in vitro sur les fibroblastes de la malade).

IV. FORMES A TYPE D'HIRSUTISME ISOLE

L'observation présentée se rapproche de ces formes au cours desquelles la fonction génitale est respectée.

Ici, la symptomatologie clinique est représentée presque exclusivement par un hirsutisme. L'absence d'aménorrhée, voire même les possibilités d'évolution d'une grossesse sont un bel exemple de l'absence de parallélisme entre le retentissement clinique et les perturbations biologiques, et de l'extrême variabilité de la réceptivité des tissus cibles aux androgènes.

Cliniquement, ces formes se présentent comme un hirsutisme de degré variable, souvent très banal, apparaissant volontiers en période pubertaire. On ne peut de toute évidence affirmer formellement une telle forme symptomatique que si l'on dispose d'un recul suffisant pour éliminer les formes de début paucisymptomatiques qui se complèteront ultérieurement. C'est en général le cas des quelques observations publiées dans la littérature, puisque le diagnostic n'est pas fait d'emblée (27,62,63,69,92,100,75et 127,106,139 et 140). Par ailleurs, les règles ne sont pas modifiées, tout au plus peut-on noter une hypertrophie clitoridienne modérée (63,139 et 140).

Au maximum, une GROSSESSE peut évoluer chez une femme porteuse d'un corticosurrénalome virilisant. GALLAIS, en 1911 (59), en présentait déjà deux cas, dont l'un paraît certain. La gestation se termine le plus souvent avant terme :

avortement spontané (106)

6 fausses couches en 4 ans (100)

foetus de 4 mois trouvé dans l'utérus au moment de l'intervention chirurgicale (144)

L'observation de COHEN et THOMAS (28) est unique : grossesse avec mise au monde d'un enfant normal de sexe féminin, ayant par la suite été examinée à l'âge de deux ans et ne présentant alors aucune anomalie sexuelle externe.

Quant au profil biochimique, il est dans ces cas sans particularité : taux de 17 oxostéroïdes élevés, avec prédominance des fractions contenant la DHEA ; seul, le cas de PRUNTY

(139 et 140) semble comporter peu de DHEA : 17 oxo-stéroïdes à 29,8 mg/24h dont seulement 1,2mg de β 17 C.S. après précipitation par la digitonine (fraction β contenant la DHEA).

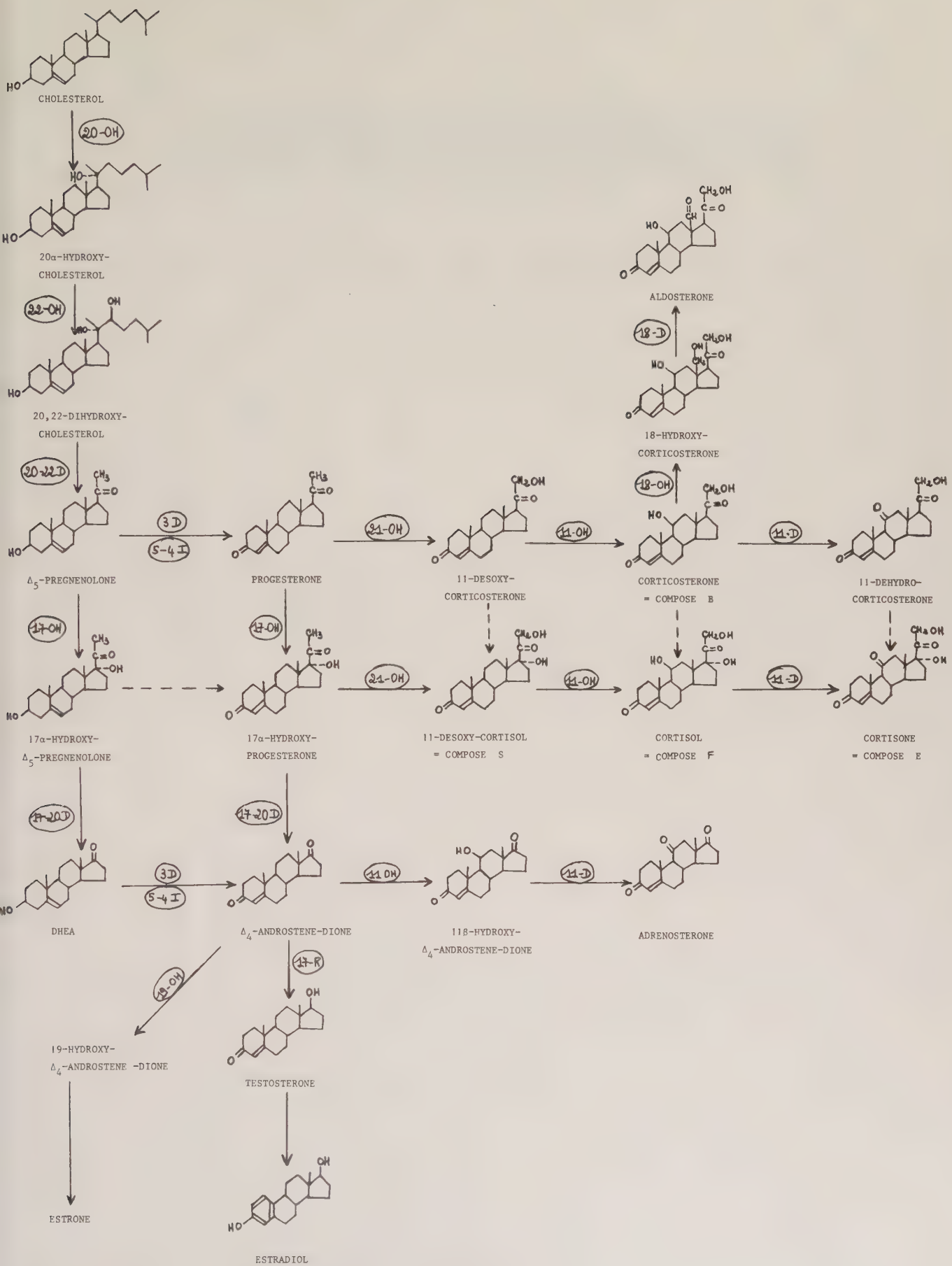
La pathogénie de tels tableaux n'est pas claire : on peut difficilement admettre une diminution de la réceptivité tissulaire aux androgènes du type de celle évoquée pour les formes tumorales pures, l'hirsutisme étant un argument de poids contre cette hypothèse, à moins qu'il ne s'agisse d'une insensibilité localisée au tissu ovarien.

RAPPEL PHYSIOLOGIQUE

L'ensemble de la physiologie corticosurrénalienne, et singulièrement la production des androgènes, apparaît particulièrement complexe si l'on tient compte de tous les phénomènes depuis la synthèse et la libération des stéroïdes par la glande surrénale (elles-mêmes dépendantes d'un système régulateur) jusqu'aux effets hormonaux sur les organes cibles, conditionnés par l'aspect quantitatif et qualitatif des stéroïdes qui y parviennent.

I. LA STEROIDOGENESE NORMALE

Elle est schématisée dans la figure n° 1 p. 48 ; les différentes enzymes qui interviennent sont codées par des abréviations dont la liste est donnée p. 49 (noms systématiques et noms usuels).



STEROIDOGENESE NORMALE (Figure n° 1)

NOMS SYSTEMATIQUES	NOMS USUELS	CODAGE UTILISE
3β-Hydroxystéroïde:NAD(P)oxydoréductase	3β -Hydroxystéroïde deshydrogénase	3-D
17β-Hydroxystéroïde:NADP 17β-oxydoréductase	testostérone 17β-deshydrogénase (17 céto-réductase)	17-R
Steroid,reduced-NADP:oxygen oxidoreductase (11β)	11β-hydroxylase	11-OH
Steroid,reduced-NADP:oxygenoxidoreductase (17α)	17α-hydroxylase	17-OH
Steroid,reduced-NADP:oxygen oxidoreductase (21)	21-hydroxylase	21-OH
Steroid,reduced-NADP:oxygen oxidoreductase (20β)	cholestérol-20-hydroxylase	20-OH
3-KetosteroidΔ4-Δ5 isomerase	Δ_{5-4} isomérase	5-4 I
	20,22-desmolase	20-22D
	22-hydroxylase	22 OH
	17,20-desmolase	17-20D
	11β-hydroxy-deshydrogénase	11-D
	18-hydroxylase	18-OH
	18-hydroxy-deshydrogénase	18-D
	19-hydroxylase	19 OH

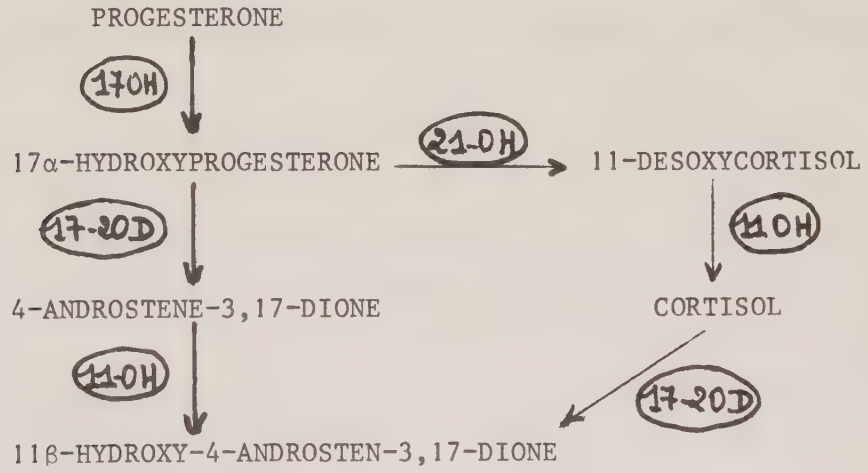
ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA SYNTHESE ET LA CONVERSION DES STEROIDES

(Noms systématiques attribués par la Commission des Enzymes)

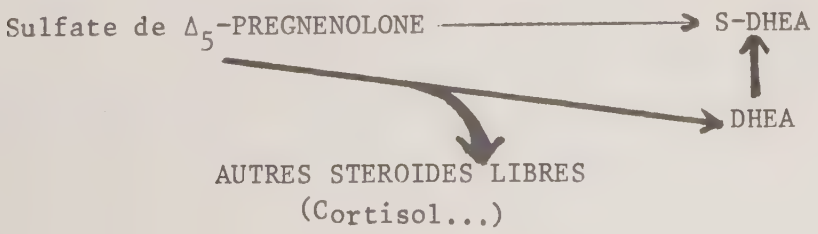
Cette représentation de la stéroïdogenèse (p.48) n'indique évidemment que les voies quantitativement les plus importantes. De nombreuses études de la stéroïdogenèse au niveau de la surrénale normale (en particulier les travaux basés sur la transformation de précurseurs marqués par des cultures de cellules surrénaliennes) ont permis de mettre en évidence d'autres voies possibles mais mineures.

Signalons les résultats de trois travaux effectués sur la surrénale humaine :

1° Démonstration de la synthèse de 11β-hydroxy-4-androsten-3,17-dione à partir de la 17α-hydroxyprogestérone, par une voie accessoire passant par le cortisol et non par la 4-androstène-3,17-dione (91) :



2° Précision des modalités de sécrétion de la dehydroépiandrostérone (DHEA) sous forme libre ou sulfoconjuguée, le sulfate de prégnènolone se transformant préférentiellement en stéroïdes libres (38) :



3° Mise en évidence, dans la surrénale adulte normale, d'une activité 16α-hydroxylase aboutissant en particulier à la formation de 16α-hydroxyprogestérone et de 16α-hydroxy-Δ_5-prégnènolone (143).

II. LES INTERCONVERSIONS PERIPHERIQUES

Leur existence conditionne de façon majeure la notion qu'un dosage plasmatique (sang périphérique), et à plus forte raison un dosage urinaire, constituent un reflet très imparfait, voire même totalement erroné, de la sécrétion corticosurrénalienne.

La définition de plusieurs termes mérite d'être rappelée :

- le taux de sécrétion d'un stéroïde est la quantité par 24 heures réellement libérée par la surrénale.

- son taux de production tient compte en plus des phénomènes d'interconversion périphérique et constitue une bonne évaluation de la quantité du stéroïde incriminé qui a circulé par 24 heures. Il se calcule selon la formule :

TAUX DE PRODUCTION = CONCENTRATION PLASMATIQUE X CLEARANCE METABOLIQUE

la clearance métabolique étant la quantité de stéroïde épurée du plasma, par 24 heures, par le foie et les territoires extra-hépatiques, en particulier les organes cibles.

Les mesures de clearance métabolique font appel à des méthodes radio-isotopiques.

Ainsi, chez la femme normale, la testostérone plasmatique provient pour 70 % d'une transformation par le foie de la 4-androstène-3,17-dione sécrétée par la surrénale et l'ovaire.

Par ailleurs, la métabolisation potentielle d'un produit, autrement dit son activité hormonale, est fonction de la forme sous laquelle il circule :

- C'est d'une part le problème de la DHEA, qui est produite soit sous forme de sulfate soit sous forme libre : la forme libre est immédiatement disponible tandis que la forme sulfoconjuguée est très peu métabolisée, mais représente un précurseur potentiel d'androgènes par rupture de la liaison sulfate sous l'action d'une sulfatase.

- C'est d'autre part le rôle joué par les protéines transporteuses des androgènes : la 4-androstène-3,17-dione circule pratiquement totalement libre, tandis que la protéine transporteuse de la testostérone ou TeBG (testosterone-estradiol-binding-globulin) joue un rôle majeur dans le pouvoir virilisant de la testostérone, puisque seule la testostérone libre est active au niveau des tissus cibles. Comme l'a montré VERMEULEN (181), la clearance métabolique varie parallèlement à la quantité de testostérone non liée à la TeBG.

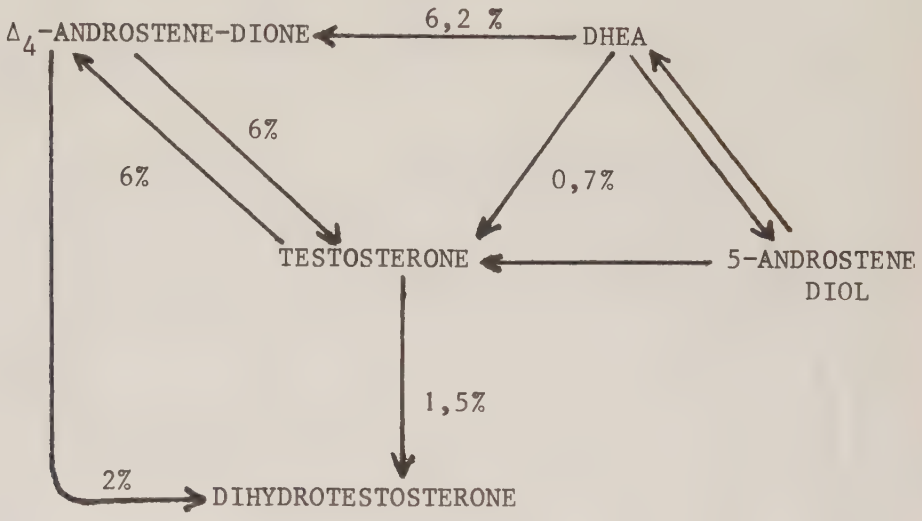
Les figures n°2 page 53 et n°3 page 54 schématisent les principaux aspects de l'interconversion des androgènes chez le sujet de sexe féminin.

FIGURE N°2

INTERCONVERSIONS PERIPHERIQUES

Chiffres de transferts plasmatiques (rendant compte de la modification des taux plasmatiques, sans intégrer les phénomènes d'interconversions métaboliques tissulaires)

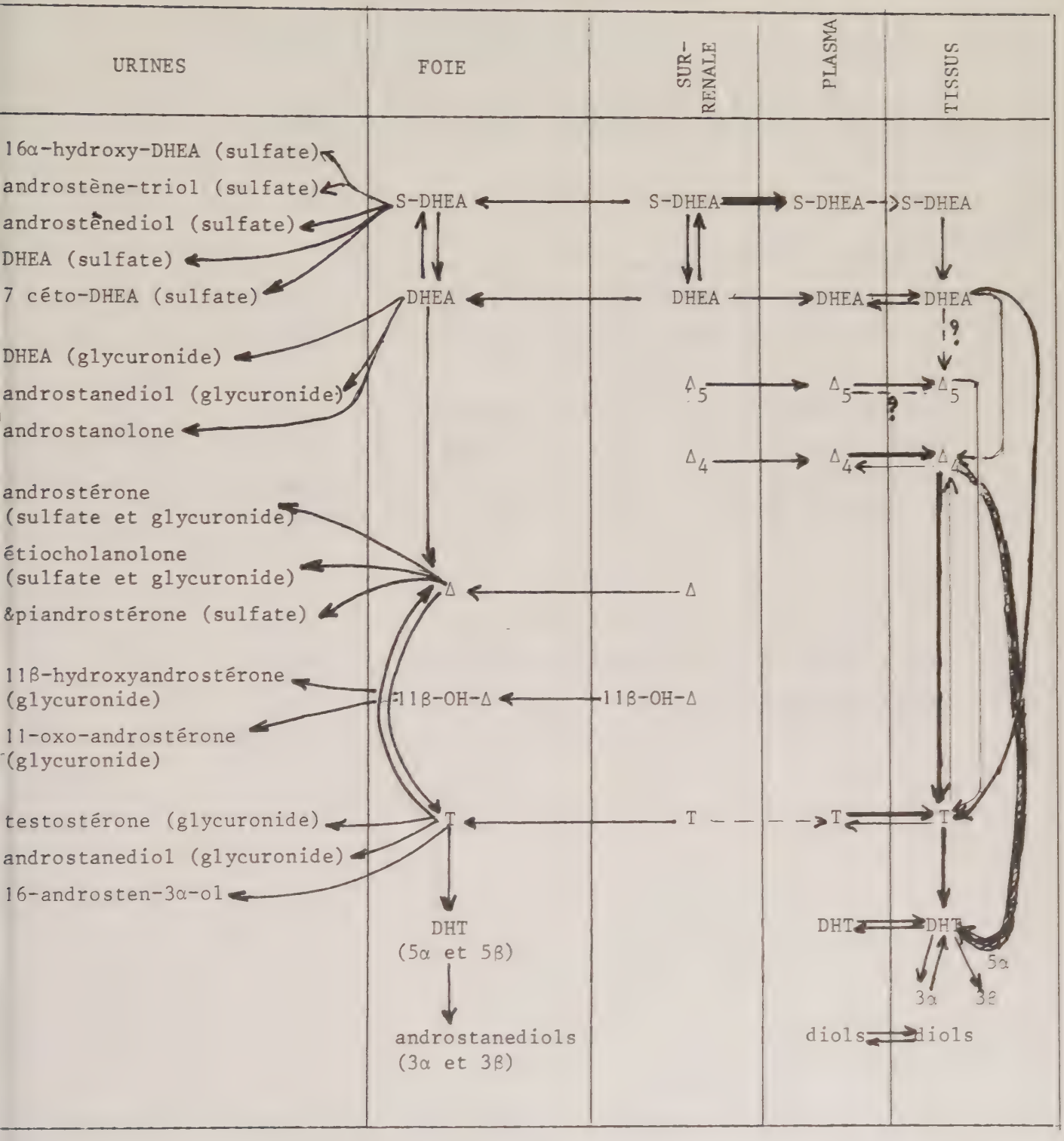
d'après MAHOUDEAU et BRICAIRE (119) , BAULIEU et coll. (11)



Ce schéma indique que la transformation de DHEA en TESTOSTERONE se fait par d'autres intermédiaires que la Δ_4-androstène-dione ; de même, la transformation de cette dernière en dihydrotestostérone passe par d'autres voies que la testostérone.

FIGURE N° 3

INTERCONVERSIONS PERIPHERIQUES



Δ = Δ4-androstène-dione
Δ4 = stéroïdes en Δ4
Δ5 = stéroïdes en Δ5

T = testostérone
DHT = dihydro-testostérone

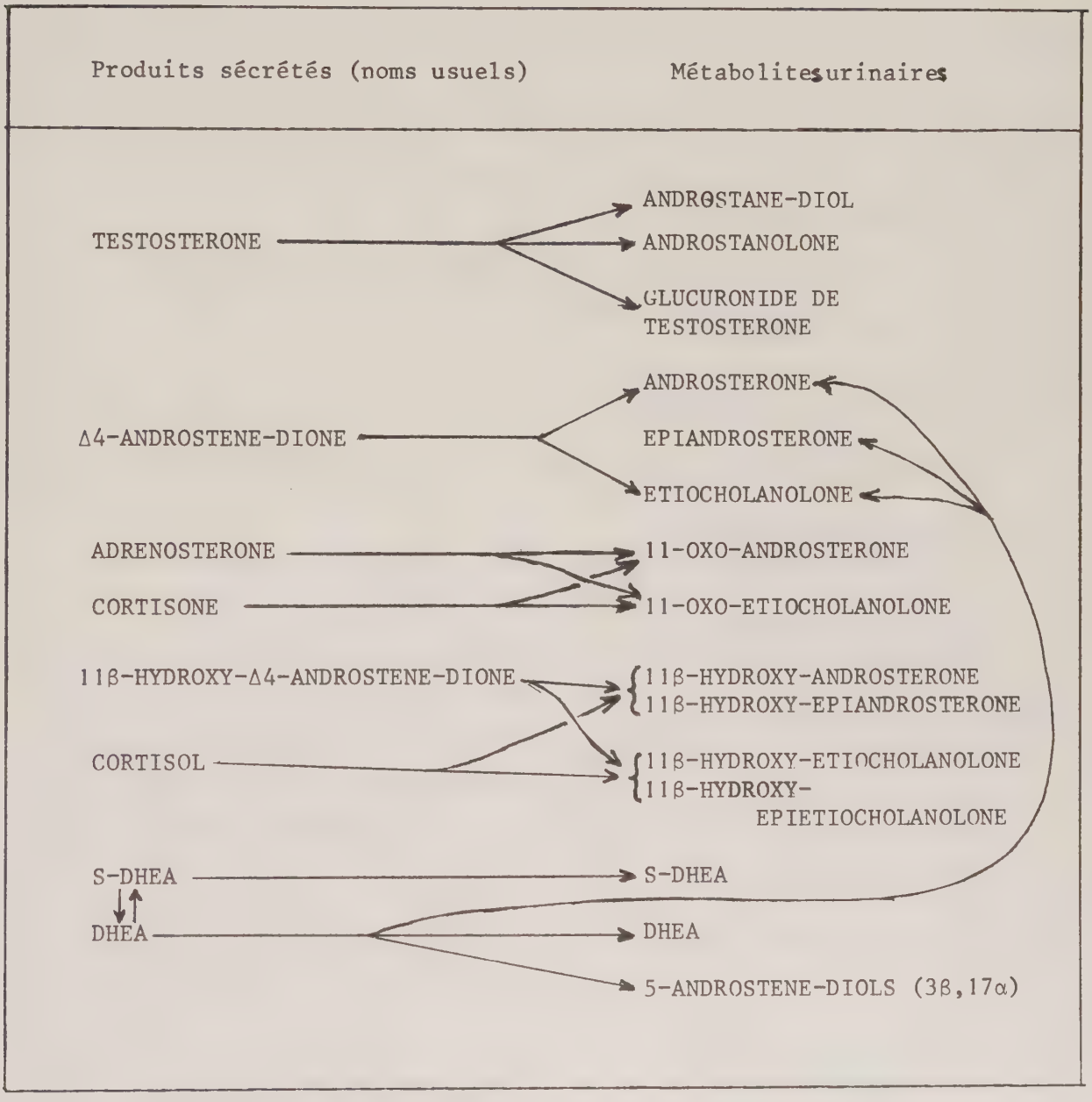
III. LE CATABOLISME ET L'ELIMINATION URINAIRE DES STEROIDES

Le foie joue un rôle majeur dans leur dégradation enzymatique, qui est dominée par des processus d'hydrogénation et aussi de sulfo- et de glycuro-conjugaison.

Pour permettre une meilleure compréhension de notre travail, basé en grande partie sur l'étude des métabolites urinaires, nous présenterons sous forme de tableaux les corrélations entre les métabolites urinaires et les produits sécrétés.

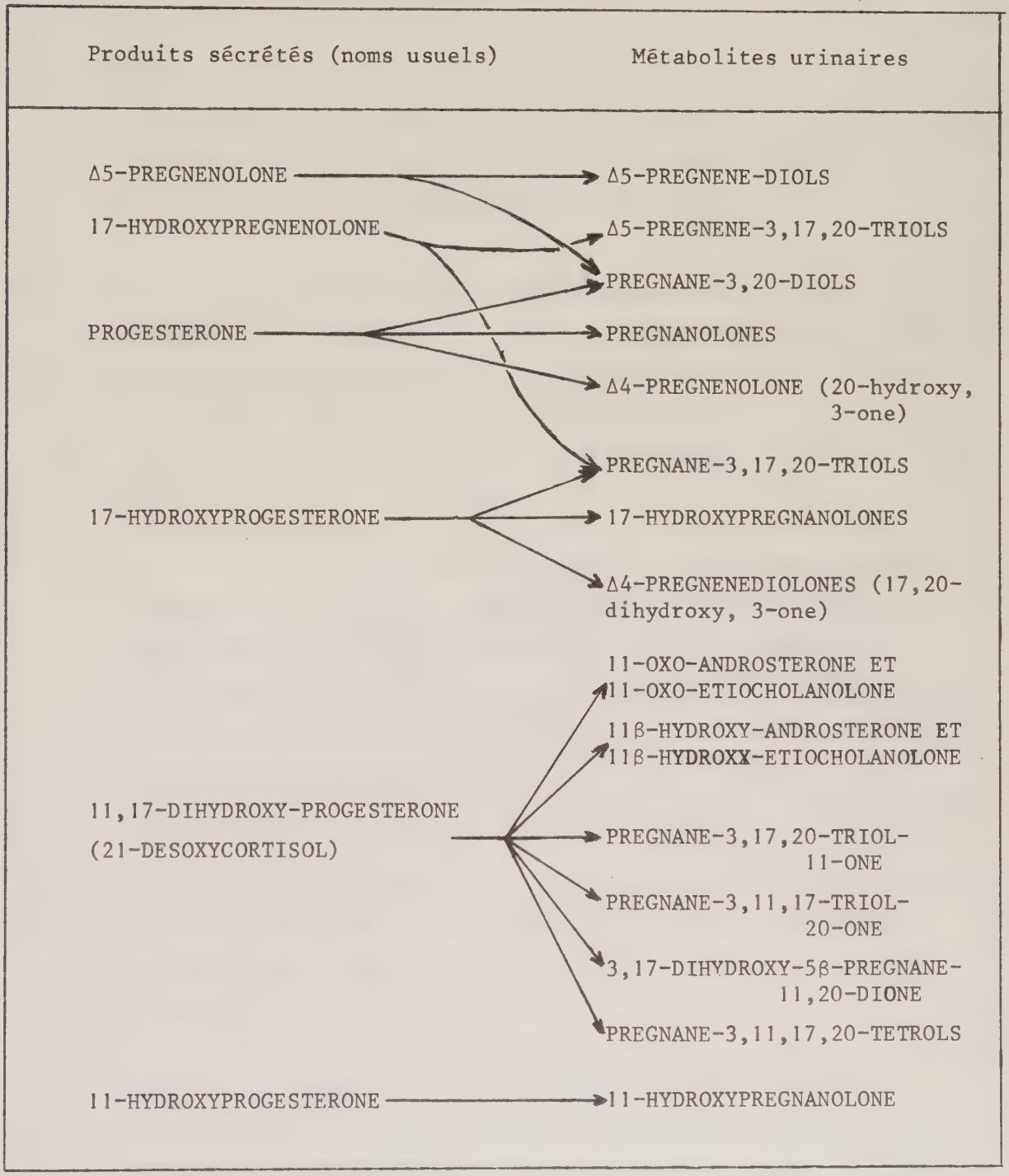
L'élimination des stéroïdes en C_{19} est présentée page 56 (tableau n°3), celle des stéroïdes en C_{21} page 57 (tableau n°4). Ces tableaux indiquent bien qu'un métabolite urinaire, SURTOUT LORSQU'IL S'AGIT D'UN STEROIDE EN C_{19}, est loin d'avoir une origine unique.

ELIMINATION URINAIRE DES STEROIDES EN C_{19} (Tableau N°3)



ELIMINATION URINAIRE DES STEROIDES EN C_{21} (Tableau n°4)

(à l'exclusion des dérivés du cortisol et de l'aldostérone)



IV. LA REGULATION DE LA STEROIDOGENESE

Le rôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire corticotrope est actuellement universellement connu et admis, en ce qui concerne aussi bien la décomposition des étapes successives de stimulation que l'existence d'un rétro-contrôle ou feed-back.

Par contre, des données plus récentes se sont fait jour, concernant le mécanisme d'action de l'ACTH au niveau des cellules surrénaliennes, ainsi que les phénomènes de base des activations des enzymes impliquées dans la stéroîdogenèse. Nous nous limiterons, dans le cadre de ce rappel, à faire le point de ces aspects récents.

Leur connaissance est basée sur des techniques histochimiques et ultrastructurales élaborées, sur des études de préparations de cellules isolées, de fractions membranaires, mais surout sur la mise au point de techniques de cultures surrénaliennes (soit culture organotypique,soit culture cellulaire monocouche avec essai d'obtention d'une lignée pure et stable par transplantations ou repiquages successifs). S'il est relativement facile d'obtenir une culture à long terme de cellules tumorales ou en provenance de nouveaux-nés du fait de leur plus grandes potentialités métaboliques, les cultures de cellules de surrénales de sujet adulte sont beaucoup plus délicates à conserver.

Si les cultures de cellules tumorales rendent de grands services quant à la suspicion des phénomènes, il faut se garder d'extrapoler totalement les résultats obtenus au cas de la surrénale saine. C'est tout particulièrement le cas de l'étude des effets de l'ACTH, puisque, nous le reverrons, les tumeurs

peuvent comporter une perte de leur sensibilité ou de la spécificité de leurs récepteurs à l'ACHT. Il nous paraît important de préciser ce point, qui intervient au premier plan dans la discussion de la pathogénie des tumeurs corticosurrénaliennes.

Les données présentées ci-dessous s'appuient strictement sur des travaux effectués sur des surrénales normales.

L'ACTH EXERCE SUR LA CELLULE SURRENALIENNE UNE ACTION DOUBLE :

- MORPHOLOGIQUE (effet sur la croissance cellulaire)
- HORMONALE (effet sur la stéroïdogenèse).

Pour exercer ces actions, il faut au préalable qu'elle se lie à un récepteur membranaire de la cellule surrénalienne en restant extérieure à cette cellule.

Ces mécanismes, qui font intervenir la formation d'adénosine-mono-phosphate-3',5'-cyclique, ou AMPc, se sont peu à peu précisés à la suite des travaux de SUTHERLAND (68), quoique la filiation ACTH - AMPc - stéroïdogenèse ne soit plus admise de façon aussi formelle et univoque.

A. L'ETAPE MEMBRANAIRE

Elle comporte elle-même deux stades successifs :

1° La liaison proprement dite de l'hormone au récepteur

. RELATION STRUCTURE-ACTIVITE :

La molécule d'ACTH est constituée de 39 acides aminés dont les 24 premiers sont communs à toutes les espèces et responsables de l'activité biologique alors que les 15 derniers diffèrent

d'une esp!ce à l'autre et portent le site antigénique.

Les travaux de SAEZ (157) ont permis de démontrer que la séquence 11-24 est responsable de la liaison de l'ACTH au récepteur, liaison de haute affinité et de haute spécificité , la séquence 1-10 augmentant les capacités de liaison de l'ACTH 11-24 au récepteur.

. LIEU :

Cette liaison se produit au niveau d'un site récepteur situé à la face externe de la membrane de la cellule surrénalienne.

. CINETIQUE :

Cette liaison est rapide : 10 minutes à + 37°C, 20 minutes à + 4°C (157).

2° L'activation de l'adényl-cyclase :

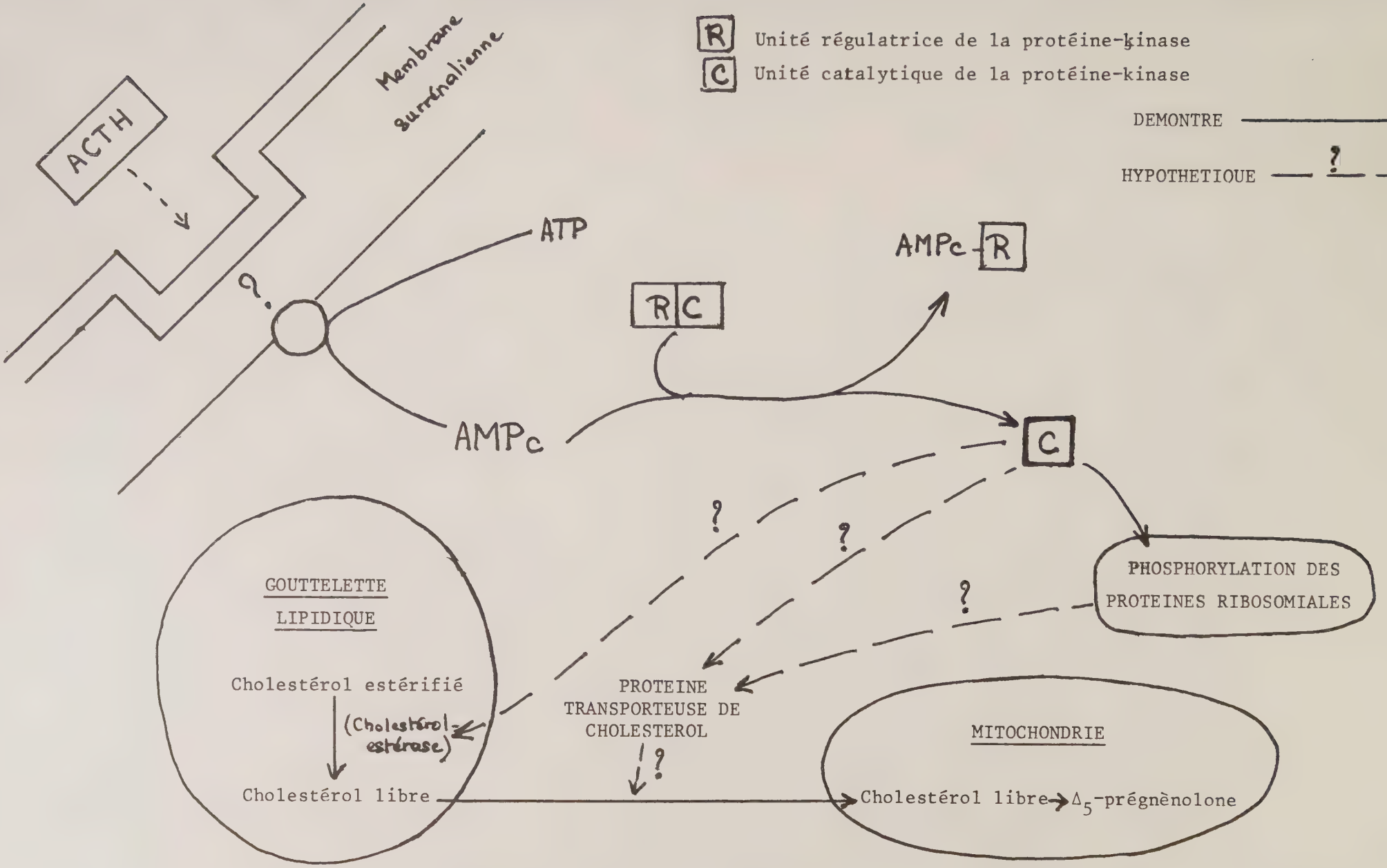
L'adényl-cyclase est un système enzymatique situé à la face interne de la membrane cellulaire, et permet la formation d'AMPc à partir de l'ATP, donc son activation a pour effet d'augmenter le taux intra-cellulaire d'AMPc.

3° Les phénomènes de couplage membranaire entre ces deux étapes répondent à des mécanismes non encore élucidés.

Ces divers points sont schématisés dans la figure n°4 page 61.

B. L'ETAPE CYTOPLASMIQUE

La conséquence de la liaison ACTH-récepteur est donc une augmentation de la concentration intra-cellulaire en AMPc, qui va elle-même aboutir) l'activation d'une protéine-kinase AMPc-dépendante. Cette protéine-kinase a été mise en évidence dans de nombreux tissus et chez de nombreuses espèces (109), et bien caractérisée dans la surrénale (64) ; elle se définit comme une enzyme stimulée par l'AMPc et capable de phosphoryler certaines protéines.



SCHEMA D'ACTION DE L'ACTH AU NIVEAU DE LA CELLULE SURRENALIENNE (d'après RIOU, 145)

Le schéma actuellement reconnu (figure n° 4 p. 61) comporte la liaison de l'AMPc à l'unité R (régulatrice) de la protéine-kinase, ce qui libère son unité C (catalytique). La protéine-kinase sous forme d'holoenzyme R-C est inactive.

En fait, à l'échelon cytoplasmique, il faut envisager séparément l'action de l'ACTH sur la croissance cellulaire et sur la stéroïdogenèse : en effet, les mécanismes en sont différents, et surtout n'impliquent pas toujours, ou du moins pas toujours de façon exclusive, l'enchaînement ACTH - AMPc - Protéine-kinase que nous venons de décrire. Il semble d'ailleurs exister deux sites récepteurs différents pour ces deux actions de l'ACTH.

1° Effet sur la croissance cellulaire :

L'ACTH stimule l'activité ARN-polymérase I indépendamment d'un effet hormonal; cette stimulation étant bloquée par le cycloheximide (inhibiteur des synthèses protéiques) mais non par l'aminogluthétimide, inhibiteur de la stéroïdogenèse (52). Il s'agit d'une action lente, dont le médiateur n'est probablement pas l'AMPc (147).

2° Effet sur la stéroidogenèse :

a) L'ACTH contrôle essentiellement les premières étapes de la stéroïdogenèse, c'est-à-dire la transformation du cholestérol en Δ_5-prégnènolone, qui comporte plusieurs stades :

. Il y a transformation, au sein des goutelettes lipidiques, du cholestérol estérifié en cholestérol libre, sous l'effet d'une cholestérol-estérase. Or l'ACTH stimule l'accumulation de cholestérol libre dans les goutelettes lipidiques (60). Il est possible mais non totalement certain que la cholestérol-estérase puisse être stimulée par la protéine-kinase (18).

. Puis, le cholestérol libre est transporté jusqu'aux mitochondries. Ici se situe le point d'impact essentiel de l'ACTH : il s'agit de l'étape limitante. Les modalités en sont encore mal connues, mais l'existence d'une protéine

transporteuse de cholestérol est probable (177).

. Enfin, dans les mitochondries, le cholestérol est transformé en Δ_5-prégnènolone après action des 20- et 22-hydroxylases et d'une 20-22 desmolase. Ici, l'ACTH n'exerce pas d'action directe, mais joue un rôle indirect par le fait qu'il approvisionne la mitochondrie en cholestérol libre.

b) Bien que sa présence ne soit pas indispensable, l'ACTH peut stimuler les étapes suivantes de la stéroïdogenèse, situées après la formation de la Δ_5-prégnènolone.

L'activité de quelques enzymes a été trouvée beaucoup plus élevée dans des cultures de cellules surrénaliennes mises en présence d'ACTH que dans des cultures sans ACTH ; ainsi en est-il de la 17α-hydroxylase chez le lapin (170), de la 21-hydroxylase et de la 18-hydroxylase chez le rat (133), de la 11β-hydroxylase chez le rat (133) et chez le foetus humain (126), de la 3β-hydroxystéroïde-oxydoréductase et de la Δ_{5-4}-isomérase chez le rat (101), de la 16α-hydroxylase chez l'homme (143).

En l'absence d'ACTH, toutefois, ces activités enzymatiques sont trouvées pour la plupart faiblement diminuées ; seule l'activité 21-hydroxylase a été trouvée inexistante chez le rat (133).

Un fait constant est l'action inhibitrice exercée par l'ACTH sur la 20α-réductase : dans des cultures cellulaires de surrénale de rat dépourvues d'ACTH, la progestérone est transformée préférentiellement en 20α-dihydroprogestérone, avec une production faible de corticostérone ; l'adjonction d'ACTH inverse les phénomènes : la production de 20α-dihydroprogestérone baisse au profit de la corticostérone (124,133).

Ce phénomène est intéressant à noter car il est retrouvé à propos de l'étude de la stéroidogenèse des tumeurs surrénaliennes animales. Un tel fait, toutefois, n'a pas été noté chez l'homme. Or on connaît des différences enzymatiques d'une espèce à l'autre, et il faut se garder de conclusions trop hâtives par simple analogie entre espèces.

c) Comme nous l'avons évoqué plus haut, les effets de l'ACTH sur la stéroïdogenèse ne paraissent pas être résumés par le simple enchaînement ACTH - AMPc - protéine-kinase. - activations enzymatiques. Deux questions sont en effet soulevées :

. L'AMP cyclique est-il le médiateur exclusif de l'action de l'ACTH sur la stéroïdogenèse ?

. l'AMP cyclique est-il l'intermédiaire exclusif par lequel l'ACTH active la protéine-kinase et quel est l'effet de cette dernière sur la stéroïdogenèse ?

L'AMPc EST-IL LE MEDIATEUR EXCLUSIF DE L'ACTION DE L'ACTH SUR LA STEROIDOGENESE ?

La réponse est négative.

Certes il existe un parallélisme de réponse : ACTH etAMPc stimulent tous deux la stéroïdogenèse, et entraînent des modifications ultrastructurales superposables en relation avec la stimulation des activités enzymatiques, à savoir la prolifération du réticulum endoplasmiqe lisse, la réorganisation de la membrane interne des mitochondries avec formation de vésicules intramitochondriales (126,132,147).

Mais les études basées sur les notions de cinétique et de doses affirment que l'AMPc n'est pas indispensable pour la stimulation de la stéroïdogenèse par l'ACTH et qu'il n'en serait pas le médiateur unique (12,45,128,142) : la stimulation de la stéroïdogenèse peut apparaître sans augmentation des taux intra-cellulaires d'AMPc, cette stimulation persiste plus longtemps que l'élévation de l'AMPc intra-cellulaire.

Sans anticiper sur les données physiopathologiques, nous pouvons souligner dès à présent que, s'il existe une association entre une ANOMALIE DE LA STEROIDOGENESE et une ANOMALIE DE L'ACTIVATION DE L'ADENYL-CYCLASE, on ne peut PAS établir formellement une RELATION DE CAUSE A EFFET entre ces deux constatations.

Toutefois, la notion d'une dissociation des réponses stéroïdogéniques par rapport à la formation d'AMPc est toujours difficile à affirmer, car il faut tenir compte de notions de

cinétique et de compartimentalisation cellulaire de l'AMPc dans la détection de sa production (173).

La nature d'autres systèmes activateurs reste très hypothétique : le rôle du GMPc (guanosine-mono-phosphate cyclique) a été suspecté comme autre intermédiaire possible entre l'ACTH et la stéroïdogenèse, mais ces résultats sont basés sur des études de tissu tumoral (166 bis). et n'apportent pas de preuve formelle.

L'AMPc EST-IL LE MEDIATEUR EXCLUSIF PAR LEQUEL L'ACTH ACTIVE LA PROTEINE-KINASE, QUEL EST L'EFFET DE CETTE DERNIERE SUR LA STEROIDOGENESE ?

Là encore, il faut admettrel'absence de parallélisme entre la formation d'AMPc et l'activation de la protéine-kinase, d'une part, entre l'activation de la protéine-kinase et l'effet sur la stéroïdogenèse, d'autre part.

Certes, ACTH, AMPc et protéine-kinase stimulent la phosphorylation des protéines cytosoliques et surtout ribosomiales in vivo et in vitro (60,146,186,187). Mais l'ACTH peut agir sur la protéine-kinase par un mécanisme autre que la formation d'AMPc :

. Une concentration d'ACTH suffisante pour obtenir une stéroïdogenèse maximale n'induit qu'une augmentation de 30% de l'activité kinasique et surtout une augmentation très faible de l'AMPc (164)

. Il a été observé, après adjonction d'ACTH à des homogénats de tissu surrénalien, une augmentation très rapide de la protéine-kinase, dans des délais excluant un intermédiaire (augmentation du taux intra-cellulaire d'AMPc ou stimulation de la liaison AMPc - R (167).

Enfin, en dehors de la probable stimulation de la cholestérol-estérase par la protéine-kinase, l'intervention de processus de phosphorylation au cours de la stéroïdogenése est totalement hypothétique.

d) L'ensemble de ces considérations donne peut-être l'explication des particularités cinétiques de la réponse stéroïgénique à l'ACTH : tandis que la réponse à l'AMPc dépend simplement de la dose administrée, la réponse à l'ACTH dépend de la

dose totale administrée, comme cela a été montré in vitro au niveau de la surrénale humaine (135).

On obtient un effet sur la stéroïdogenèse qui est très différent selon que l'ACTH est administré en aigu ou en chronique : ainsi, chez le lapin, l'activité 17α-hydroxylase, non modifiée par rapport à l'activité basale par une injection unique d'ACTH, est stimulée par l'administration prolongée d'ACTH (170). Ceci a été retrouvé pour d'autres activités enzymatiques et dans d'autres espèces : effet de ce type noté en particulier pour la 11β-hydroxylase chez le foetus humain (147)

ETUDE BIOLOGIQUE DES CORTICOSURRENALOMES VIRILISANTS (Synthèse des connaissances actuelles)

Nous subdiviserons cette étude biologique en quatre parties : la première étant une revue générale de tous les stéroïdes identifiés dans les urines au cours de corticosurrénalomes virilisants, sans tenir compte de leur importance quantitative relative, la deuxième partie, une description de l'aspect quantitatif le plus habituellement réalisé par ces tumeurs, ainsi que les variantes extrêmes observées. Puis la troisième partie exposera les données actuellement connues de la stéroïdogenèse tumorale d'après les dosages de stéroïdes plasmatiques (sang veineux surrénalien et sang veineux périphérique), tumoraux et les résultats d'études isotopiques.Ces trois premières parties donnent un reflet statique des stéroïdes produits par ces corticosurrénalomes.

La quatrième partie sera consacrée à leur étude dynamique : tests de freinage et de stimulation habituellement utilisés en exploration fonctionnelle, mais surtout exposé des travaux consacrés au mécanisme d'action de l'ACTH dans ces tumeurs et des hypothèses pathogéniques qui en découlent.

I. ETUDE QUALITATIVE STATIQUE DES METABOLITES URINAIRES

Les métabolites urinaires mis en évidence dans les urines de sujets porteurs de corticosurrénalomes virilisants sont les suivants :

A. STEROIDES EN C_{19}

Ils sont présentés dans les tableaux n° 5 à 8 pages 70 à 73.

B. STEROIDES EN C_{18}

Nous n'envisagerons pas leur étude en détail : il s'agit des estrogènes estrone, estradiol et estriol, et de certains de leurs dérivés, en particulier hydroxylés en 16.

C. STEROIDES EN C_{21}

Deux groupes de métabolites urinaires sont d'importance mineure :

- les dérivés minéralocorticoïdes, catabolites tétrahydrogénés de l'aldostérone, de la corticostérone et de la 11-désoxycorticostérone (ces produits s'éliminant également tels quels dans les urines en faible quantité).

- les dérivés du cortisol, de la cortisone et du 11-desoxycortisol, qui sont éliminés tels quels, et sous forme tétra- ou hexa-hydrogénée (tableaux n°9 page 74 et 10 page 75).

Les stéroïdes en C_{21} qui nous intéressent de façon majeure dans l'étude des corticosurrénalomes virilisants sont présentés dans les tableaux n°11 à 13 pages 76 à 78.

Ces tableaux ont été réalisés à partir de l'ensemble des données de la littérature, avec le but d'une étude exhaustive.

Toutes les méthodes d'analyse utilisées pour la mise en évidence de chaque produit n'ont pas été indiquées ; par contre ont été individualisés les résultats de l'étude par CGL et CGL-SM réalisée parR.J. BEGUE et J.M. BRUN dans le Laboratoire du Professeur PADIEU. L'intérêt de ces techniques apparaît ainsi très clairement puisqu'elles ont permis l'individualisation de nombreux stéroïdes non encore décrits, en particulier une étude très détaillée des androstane-triols.

NOM SYSTEMATIQUE	NOM USUEL	REFERENCES	REMARQUES
3β-hydroxy-5-androsten-17-one	DHEA	2,25 10	Prédominance du dérivé sulfoconjugué Mise en évidence du dérivé glycuro-conjugué
3β-hydroxy-5-androsten-7,17-dione	7 céto-DHEA	112,56,9	
3β,7α-dihydroxy-5-androsten-17-one	7α-hydroxy-DHEA	76,77	
3β,16α-dihydroxy-5-androsten-17-one	16α-hydroxy-DHEA	134	
3β,7α,16α-trihydroxy-5-androsten-17-one	7α,16α-dihydroxy-DHEA	76,77	
3β,16α-dihydroxy-5-androsten-7,17-dione	7 céto,16α-hydroxy-DHEA	76,77	
3α,16α-dihydroxy-5-androsten-17-one	16α-hydroxy-épiDHEA	44	
3α,16β-dihydroxy-5-androsten-17-one	16β-hydroxy-épiDHEA	13,19,20	Etude par CGL et CGL-SM

TABLEAU N° 5

STEROIDES EN C_{19} : DHEA et dérivés

NOM SYSTEMATIQUE	NOM USUEL	REFERENCES	REMARQUES
3α-hydroxy-5α-androstan-17-one	androstérone	/6,77	
3α-hydroxy-5β-androstan-17-one	étiocholanolone	24	
3β-hydroxy-5α-androstan-17-one	épiandrostérone	24	
3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione	11-oxoétiocholanolone	76,77	
3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one	11β-hydroxyandrostérone	122	
3α,11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one	11β-hydroxyétiocholanolone	76,77	
3β,15α-dihydroxy-5α-androstan-17-one	15α-hydroxyépiandrostérone	13,19,20	Etude par CGL et CGL-SM
3α,16α-dihydroxy-5α-androstan-17-one	16α-hydroxyandrostérone	13,19,20	
3β,16α-dihydroxy-5α-androstan-17-one	16α-hydroxyépiandrostérone	13,19,20	

TABLEAU N° 6

STEROIDES EN C_{19} : androstérone, étiocholanolone et dérivés

NOM SYSTEMATIQUE	REFERENCES	REMARQUES
5α-androstane-3α,17α-diol	13,19,20	Etude par CGL et CGL-SM
5α-androstane-3α,17β-diol		
5β-androstane-3α,11β,17α-triol		
5α-androstane-2α,3α,17β-triol		
5β-androstane-3α,16β,17α-triol		
5β-androstane-3α,16α,17β-triol		
5α-androstane-3β,16β,17α-triol		
5α-androstane-3α,16β,17α-triol		

TABLEAU N ° 7

ANDROSTANE-DIOLS et ANDROSTANE-TRIOLS

NOM SYSTEMATIQUE	NOM USUEL	REFERENCES	REMARQUES
17β-hydroxy-4-androsten-3-one	testostérone	58	Elimination essentiellement sous forme de glycuronide
5-androstène-3β,17α-diol		86	
5-androstène-3β,17β-diol		176 32,192	Mise en évidence par techniques de précurseurs marqués
5-androstène-3β,16ξ,17ξ-triol		76,77,85	
5-androstène-3β,16α,17β-triol		13,19,20	Etude par CGL et CGL-SM
3α-hydroxy-5α-androst-16-ène		123	

TABLEAU N° 8

AUTRES STEROIDES EN C_{19}

DERIVES TETRAHYDROGENES	CORTISOL (COMPOSE F)	3α,11β,17α,21-tétrahydroxy-5β-prégnane-20-one (THF)
		3α,11β,17α,21-tétrahydroxy-5α-prégnane-20-one (allo-THF)
	CORTISONE (COMPOSE E)	3α,17α,21-trihydroxy-5β-prégnane-11,20-dione (THE)
		3α,17α,21-trihydroxy-5α-prégnane-11,20-dione (allo-THE)
	11-DESOXY-CORTISOL (COMPOSE S)	3α,17α,21-trihydroxy-5β-prégnane-20-one (THS)
		3α,17α,21-trihydroxy-5α-prégnane-20-one (allo-THS)
DERIVES HEXAHYDROGENES	CORTISOL (COMPOSE F)	3α,11β,17α,20α/β,21-pentahydroxy-5α/β-prégnane (cortols)
	CORTISONE (COMPOSE E)	3α,17α,20α/β,21-tétrahydroxy-5α/β-prégnane-11-one (cortolones)
	11-DESOXY-CORTISOL (COMPOSE S)	3α,17α,20α/β,21-pentahydroxy-5α/β-prégnane

TABLEAU N° 9

NOM SYSTEMATIQUE	NOM USUEL	REFERENCES	REMARQUES
5β-prégnane-3α,11β,17α,20α/β,21-pentol	CORTOLS (α et β)	53	Etude à partir de précurseurs marqués
3α,17α,20α/β,21-tétrahydroxy-5β-prégnane-11-one	CORTOLONES (α et β)		
3α,17α,21-trihydroxy-5β-prégnan-20-one	THS	13,19,20	Etude par CGL et CGL-SM
3α,17α,21-trihydroxy-5β-prégnan-11,20-dione	THE	55	
3α,11β,17α,21-tétrahydroxy-5α/β-prégnan-20-one	THF		

TABLEAU N° 10

NOM SYSTEMATIQUE	NOM USUEL	REFERENCES	REMARQUES
5β-prégnane-3α,20α-diol	prégnandiol (classique)	165 53	Utilisation de précurseurs marqués
5β-prégnane-3α,17α,20α-triol	prégnanetriol (classique)	53 55,122	Utilisation de précurseurs marqués
5β-prégnane-3α,17α,20β-triol		53 55,57	Utilisation de précurseurs marqués
5β-prégnane-3α,17ξ,20ξ-triol		23	
5ξ-prégnane-3β,17ξ,20ξ-triol		24	
5β-prégnane-3α,16α,20α-triol		55	
5α-prégnane-3α,16α,20α-triol		13,19,20	Etude par CGL et CGL-SM
5β-prégnane-3α,11β,20α-triol		57	
5β-prégnane-3α,17α,20α/β,21-tétrol		53 55	Utilisation de précurseurs marqués
5β-prégnane-3α,11β,17α,20α/β-tétrol		53	Utilisation de précurseurs marqués
5β-prégnane-3α,11β,20ξ,21-tétrol		53	Utilisation de précurseurs marqués

TABLEAU N° 11

PREGNANE-DIOLS, TRIOLS ET TETROLS

NOM SYSTEMATIQUE	REFERENCES
5 -prégnène-3β,20α-diol	86
5-prégnène-3β,17α,20α-triol	89
5-prégnène-3β,17α,20β-triol	89
5-prégnène-3α,17α,20β-triol	55
5-prégnène-3α,16α,20α-triol	57
5-prégnène-3β,16α,20α-triol	88
3β-hydroxy-5-prégnen-20-one	145 bis
3α-hydroxy-16-pregnen-20-one	56
3β,17β-dihydroxy-5-prégnen-20-one	87
3β,16α-dihydroxy-5-prégnen-20-one	57

TABLEAU N° 12

PREGNENE-DIOLS et TRIOLS, PREGNENOLONE et PREGNEDIOLONES

NOM SYSTEMATIQUE	REFERENCES	REMARQUES
3α,17(β)-dihydroxy-5β-prégnan-20-one	111	
3β,17α-dihydroxy-5α-prégnan-20-one	13,19,20	Etude par CGL et CGL-SM
3α,16α-dihydroxy-5α-prégnan-20-one	13,19,20	
3α,11β-dihydroxy-5β-prégnan-20-one	56	

TABLEAU N° 13

HYDROXYPREGNANOLONES

II. ASPECT QUANTITATIF

Il est extrêmement variable d'un cas à l'autre. Nous n'en présenterons qu'une vue d'ensemble avant d'insister sur quelques cas particuliers.

Les 17 oxo-stéroïdes neutres totaux (ou 17 O.S.), qui ne correspondent pas à la totalité des stéroïdes androgènes en C_{19} excrétés, puique en particulier ils ne comportent pas les androstane- et andrstène-diols et -triols, varient depuis des taux à peine augmentés (20 mg/24h ou même moins) jusqu'à des taux énormes de 2 g/24h comme dans une observation de SAEZ, LORAS, MORERA et BERTRAND (156). Les chiffres moyens rencontrés sont de 100 à 300 mg/24h.

Dans la plupart des cas, ils sont représentés essentiellement par la DHEA, qui peut entrer dans leur composition pour 30 à 85%, en étant elle-même plus ou moins augmentée en valeur absolue.

L'androstérone et l'étiocholanolone représentent 30 à 40% des 17 OS, chiffre variable selon le pourcentage représenté par la DHEA. Il n'y a pas, en général, de prédominance de l'un de ces deux composés par rapport à l'autre.

Les androstane-diols et androstane-triols, androstène-diols et androstène-triols, reflet de la sécrétion de DHEA et de testostérone, sont augmentés.

Les estrogènes sont à un taux normal ou discrétement élevé.

Parmi les stéroïdes en C_{21} , les dérivés des glucocorticoïdes sont normaux ou augmentés modérément. Par contre, on observe une inflation constante, mais plus ou moins accentuée, des métabolites des précurseurs des androgènes (progestérone, prégnènolone et leurs formes hydroxylées en 17) : élévation des prégnandiols, des prégnanolones, des prégnanetriols, des prégnènediols, des prégnènolones et des prégnènetriols, avec en général prédominance des produits suivants :

5β-prégnane-3α,20α-diol,

5β-prégnane-3α,17α,20α-triol,.

Même si 1'on peut admettre des variantes dans ce profil biochimique, quelques publications font état de chiffres très discordants par rapport aux données générales que nous venons d'exposer, et méritent mention.

DANS QUELQUES CAS DECRITS, en effet, LA DHEA EST EN QUANTITE TRES FAIBLE aussi bien en valeur absolue qu'en pourcentage ; nous résumons ci-dessous quelques-unes de ces publications :

1° PRUNTY (139-140) : 1,2 mg/24h de β-17 OS sur 29,8 mg/24h de 17 OS totaux ; il s'agit d'une tumeur maligne à forme d'hirsutisme pur.

2° JAILER, LOUCHART et CAHILL (93) : absence d'augmentation de la fraction β pour 35 mg de 17 OS ; cette observation est donc peu précise, d'autant qu'elle ne fait pas mention d'un dosage de prégnanetriol.

3° DOHAN, ROSE et coll.(36) : 27 mg seulement de DHEA pour 185 mg de 17 OS ; pas de notion d'un dosage de prégnanetriol

4° HAMWI, SERBIN et KRUGER (83) : aucune trace de DHEA pour des taux de 80 à 185 mg de 17 OS, ceux-ci s'abaissant à 40 après administration de 9α-fluoro-cortisol, et s'élevant au-dessus de 200 sous ACTH ; par ailleurs, taux élevé de prégnane-triol, oscillant entre 11 et 60 mg/24h ; cliniquement, aménorrhée primaire avec hypertrophie clitoridienne et hirsutisme qui seraient apparus vers l'âge de 10 ans ; de plus, la persistance de taux élevés des 17 OS en post-opératoire soulève le diagnostic de persistance de tissu tumoral, ou d'une hyperplasie au niveau de l'autre glande, ou encore d'une tumeur surrénalienne, sécrétante ou non, survenue sur une hyperplasie surrénale congénitale.

5° KENNY et coll. (104) : 2 cas de tumeur virilisante où la DHEA représente 4% des 17 OS; ces derniers variant de 27 à 63 mg/24h ; le dosage du prégnanetriol n'est pas mentionné, mais la dexaméthasone ne fait pas diminuer le taux des 17 OS.

Ces publications, déjà anciennes, sont peu précises quant à l'étude globale de tous les stéroïdes excrétés. Leur intérêt réside dans les questions qu'elles soulèvent :

. diagnostic différentiel avec une hyperplasie surrénale congénitale par déficit en 21-hydroxylase, essentiellement lorsque le prégnanetriol est élevé.

. existence d'un déficit enzymatique au sein des mécanismes de stéroïdogenèse tumorale.

Les mêmes questions sont effectivement posées par les RARES OBSERVATIONS OU LE PREGNANETRIOL EST TRES ELEVE : c'est tout particulièrement le cas de la publication de FUKUSHIMA (53) où le taux de prégnane-triol est de 120 mg/24h pour des 17 OS à 100 mg/24h ; toutefois, ici, le taux de DHEA est normalement élevé, à 48,4 mg/24h. Notons que cette observation ne comporte pas d'étude dynamique.

Plus récemment, DLUHY et coll. (35) ont présenté un cas similaire : jeune femme présentant une longue histoire d'aménorrhée pratiquement isolée, ayant depuis 9 ans des taux de 17 OS oscillant entre les valeurs et 30 mg/24h, augmentés par l'ACTH et freinés par la dexaméthasone. Une tumeur surrénalienne à potentiel hautement malin est découverte à l'occasion d'une brusque ascension des 17 OS à 300 mg/24h, avec élévation des taux urinaires de testostérone, d'estrogènes, de THS (4,8 mg/24h) et surtout de prégnanetriol (60 mg/24h) ; cette fois-ci, la dexamethasone n'a aucune influence sur ces sécrétions. Il n'est pas fait mention du taux de DHEA, ni de l'effet de l'administration d'ACTH. Cette observation en deux temps évoque fortement la survenue d'une tumeur sécrétante sur une hyperplasie antérieure, l'inflation hormonale tumorale ayant révélé un peu plus un déficit enzymatique en 21- et 11β-hydroxylase.

Sans anticiper sur la discussion de l'existence de déficits enzymatiques au cours des tumeurs surrénaliennes, il apparaît assez évident ici qu'un tel déficit était antérieur, et n'a été que majoré par l'hypersécrétion tumorale.

Un fait capital est à noter, cependant : MEME DANS CES OBSERVATIONS SUSPECTES DE DEFICIT ENZYMATIQUE, IL N'A JAMAIS ETE MIS EN EVIDENCE DE PREGNANE-TRIOL-11-ONE.

L'observation de FUKUSHIMA citée est la seule à la mentionner qualitativement, mais cette considération est négligeable étant donné le faible taux du composé (inférieur à 0,3 mg/24h) comparativement à la masse de prégnane-triol excrété.

Les données envisagées dans la troisième partie de cette étude biologique vont apporter des notions beaucoup plus précises sur la nature exacte des sécrétions tumorales et des activités enzymatiques impliquées dans la stéroïdogenèse tumorale.

III. LA STEROIDOGENESE TUMORALE

Quatre types d'étude ont permis d'en préciser les modalités :

- les études radio-isotopiques in vivo
- le dosage des stéroïdes intra-tumoraux
- les incubations de tissu tumoral en présence de précurseurs marqués
- la comparaison des taux de stéroïdes dans le sang veineux surrénalien et dans le sang veineux périphérique.

Nous allons les envisager successivement, en précisant les résultats fournis, l'intérêt et les insuffisances de chacune de ces méthodes.

A. LES ETUDES RADIO-ISOTOPIQUES IN VIVO

Il s'agit de l'administration d'un (ou plusieurs) stéroïde précurseur marqué aux sujets porteurs de tumeurs, chez lesquels on identifie les métabolites utinaires marqués obtenus.

Parmi les nombreux travaux basés sur cette méthode, citons :

. UNGAR et DORFMAN, en 1953 (176), obtiennent de la DHEA, du 5-androstène-3β,17β-diol, de l'androstérone et de l'étiocholanolone après injection d'acétate-1-^{14}C.

. En 1960, SOLOMON, CARTER et LIEBERMAN (172) obtiennent de la DHEA à partir de 17α-hydroxyprogestérone.

. Des précisions sont fournies la même année par DORFMAN (39) qui recueille de la DHEA $^{14}C^{3}H$ en injectant du

cholestérol-^{14}C, de la prégnènolone-7α-^{3}H et de l'acide mévalonique-1-^{14}C.

En fait, ces études ont eu davantage le mérite de préciser la forme d'élimination urinaire de certains stéroïdes comme nous l'avons précédemment indiqué dans les tableaux présentant les divers stéroïdes identifiés au cours des corticosurrénalomes. En raison de l'intervention des phénomènes d'interconversion périphérique, ces méthodes n'apportent pas la mise en évidence formelle d'une activité enzymatique tumorale ou de la synthèse tumorale d'un stéroïde déterminé.

B. L'ETUDE DES STEROIDES TUMORAUX

Un tel procédé est déjà plus précis, en ce qu'il permet d'exclure les processus d'interconversion métabolique.

Là encore, les publications sont nombreuses, et seuls les principaux résultats en seront présentés. Les stéroïdes suivants ont ainsi été mis en évidence dans le tissu tumoral :

- la DHEA sous forme libre par PLANTIN, DICZFALUSY et BIRKE en 1957 (138)
- le sulfate deDHEA par BAULIEU en 1960 (7)
- la 7-céto-DHEA par BAULIEU en 1962 (8)
- la 16α-hydroxy-DHEA par SAEZ,LORAS, MORERA et BERTRAND en 1970 (155)

- l'androstérone par KELLER, HAUSER et WALSER en 1958 (103)
- l'étiocholanolone et la 11-oxo-étiocholanolone par DECOURT, MICHARD, WEINMANN, LOUCHART et BAULIEU en 1959 (32)

- la Δ_4-androstène-dione par KELLER, HAUSER et WALSER en 1958 (103)
- la 11β-hydroxy-Δ_4-androstène-dione par SAEZ, LORAS, MORERA et BERTRAND en 1970 (155)

- la testostérone par ANLIKER, ROHR et MARTI en 1956 (3)

- le 5-androstène-3β, 17β-diol par VAGUE et GARRIGUES en 1965 (61,178)

Par ces méthodes ont donc essentiellement été mis en évidence les stéroïdes en C_{19}, produits terminaux, SAEZ et coll. (155) ayant toutefois isolé de la progestérone.

Ce fait est en faveur de l'assez grande fiabilité de l'étude des stéroïdes tissulaires, l'écueil de cette méthode étant de ne pouvoir préciser si le stéroïde isolé est un produit terminal ou seulement un précurseur. Quoiqu'il en soit, les résultats seront plus probants si la preuve de la sécrétion par la tumeur d'un stéroïde est donnée par la plus grande valeur de son taux dans la veine efférente surrénalienne par rapport à son taux sanguin périphérique. Nous le reverrons dans la quatrième partie de cette étude de la stéroïdogenèse tumorale.

C. LES INCUBATIONS DE TISSUS TUMORAUX EN PRESENCE DE PRECURSEURS MARQUES

Ici, la transformation de stéroïdes précurseurs marqués radio-actifs est étudiée in vitro par leur mise en contact avec des coupes, des homogénats ou des fractions d'ultracentrifugation du tissu tumoral.

Dans ces conditions, une activité enzymatique tissulaire ne peut être formellement affirmée que si l'on observe une transformation directe, sans intermédiaire, d'un produit en

un autre (transformation impliquant l'intervention d'une seule enzyme).

Pour éviter l'énumération fastidieuse des réactions observées par les différents auteurs, nous ne ferons que donner la liste des principales activités enzymatiques trouvées au sein de tumeurs corticosurrénaliennes humaines, et affirmées sur le critère que nous venons de donner :

- 20-hydroxylase, 22-hydroxylase et 20-22 desmolase (130)
- 17α-hydroxylase (102,114,130,149,183)
- 17-20 desmolase (29,102,114,130,149)
- sulfo-kinase (permettant la formation de sulfate de DHEA (29,185) .
- 3β-hydroxystéroïde-deshydrogénase et Δ_{5-4} isomérase, les deux enzymes étant nécessaires aux transformations des produits de la série Δ_5 vers ceux de la série Δ_4 (11,114,130)
- 17 céto-réductase (102)
- 21-hydroxylase (114,184)
- 11β-hydroxylase (114,149)
- 16α-hydroxylase (114,183)

Ainsi, les activités enzymatique tumorales sont celles de la stéroïdogenèse normale.

L'intérêt majeur de ces études, en fait, est de quantifier l'activité enzymatique. C'est ainsi qu'ontété décelés, dans certaines tumeurs, des DEFICITS ENZYMATIQUES plus ou moins complets.

DOMINGUEZ et HUSEBY (37) ont étudié in vitro un fragment de corticosurrénalome survenu spontanément chez une souris, et transplanté à une autre souris ovariectomisée. Ils

ont démontré une activité normale de la 20-hydroxylase, de la 17α-hydroxylase, de la 3β-hydroxystéroïde-deshydrogénase et de la Δ_{5-4} isomérase, mais par contre une nette insuffisance des activités 21-hydroxylase, 11β-hydroxylase et 17-20 desmolase.

Des études expérimentales comparables ont été réalisées, chez l'animal, à partir de cultures de cellules tumorales : l'apparition d'une activité 20α-hydroxystéroïde-deshydrogénase, inexistante dans la surrénale normale, est un fait retrouvé à plusieurs reprises (107,136) ; nous avons évoqué plus haut l'inhibition de cette activité enzymatique par l'ACTH dans la surrénale animale normale. Il n'existe pas de cas semblable décrit chez l'homme. Dans l'un de ces cas (107), l'apparition de la 20α-hydroxystéroïde-deshydrogénase est associée à une activité 11β-hydroxylase normale, mais aussi à un déficit en 21-hydroxylase

Chez l'homme, LISBOA et coll. (114) ont retrouvé une transformation faible de l'androstène-dione 4-^{14}C en testostérone-4-^{14}C et ont conclu à un déficit en 17 céto-réductase.

Dans ce cadre ont été discutées par plusieurs auteurs les relations entre une sécrétion de DHEA en quantité importante et la prédominance des Δ_4-stéroïdes sur les Δ_5- stéroïdes : DORFMAN (40) pense qu'il s'agit d'un déficit primitif en 3β-hydroxystéroïde-deshydrogénase, avec impossibilité de passage aux dérivés Δ_4 , et donc, taux élevés de DHEA. Pour NISHIDA (130) et LISBOA (114), c'est au contraire la quantité excessive de DHEA synthétisée qui inhibe l'activité 3β-hydroxystéroïde-deshydrogénase. SAEZ, LORAS, MORERA et BERTRAND (155) ont retrouvé un contenu tumoral plus élevé en composés 5-en-3β-ol-qu'en composés 4-en-3-one, alors même qu'in vivo le taux de testostérone dans le sang veineux surrénalien n'était pas supérieur à celui du sang veineux périphérique ; ces mêmes dosages ont prouvé que cette tumeur sécrétait essentiellement de la Δ_4-androstène-dione. Il semble donc ici que la différence de contenu tumoral puisse être interprétée par la possibilité que la surrénale soit "vidée" des stéroïdes en Δ_4, produits qu'elle sécrète préférentiellement,

et contienne essentiellement des Δ_5-stéroïdes, qui constitueraient ses "réserves".

On voit donc l'importance des conditions expérimentales dans l'interprétation de ces faits, et aussi les difficultés d'émettre, à partir d'expériences in vitro, des conclusions concernant les activités enzymatiques in vivo. Ceci d'autant plus qu'à la faveur des manipulations peuvent survenir des altérations des activités enzymatiques qui fournissent le critère faussement positif d'un déficit enzymatique.

Quelques observations privilégiées ont permis d'affirmer l'existence d'un déficit enzymatique au cours de tumeurs cortico-surrénaliennes par la parfaite concordance des données in vivo (dosages plasmatiques et urinaires) et des résultats de l'incubation d'homogénats tumoraux en présence de précurseurs marqués : déficit en 17-hydroxylase dans une tumeur productrice de corticostérone (WEINSTEIN,188), déficit en 11β-hydroxylase dans une tumeur estrogéno-sécrétante (WEST,190). Nous n'avons pas trouvé de publication aussi démonstrative dans un cas de tumeur à sécrétion androgénique.

Ainsi, la comparaison des dosages veineux surrénalien et périphérique apparaît comme une méthode fiable pour affirmer la sécrétion d'un produit par la tumeur.

D. ETUDE DE LA SECRETION TUMORALE PAR LA COMPARAISON DES TAUX DES STEROIDES DANS LE SANG VEINEUX SURRENALIEN ET PERIPHERIQUE, ET LA DETERMINATION DES TAUX DE SECRETION ET DES CLEARANCES METABOLIQUES

L'ensemble des résultats de telles mesures, effectuées pour la même tumeur, permet d'affirmer qu'un stéroïde est sécrété

par la tumeur et ne provient pas de phénomènes d'interconversions périphériques.

Par comparaison des taux veineux surrénalien et périphérique, la sécrétion de sulfate de DHEA par une tumeur virilisante a été affirmée pour la première fois par BAULIEU en 1959 (6), celle de DHEA libre par SAEZ en 1967 (158), celle de 7 céto-DHEA par BAULIEU en 1961 (9).

Il en a été de même pour l'androstérone et l'étiocholanolone (32), pour la Δ_4-androstène-dione libre (191).

La testostérone est dosée pour la première fois dans le sang veineux périphérique par FINKELSTEIN et FORCHIELLI en 1961 (46) ; par la suite, le dosage simultané dans la veine efférente surrénalienne affirmera sa sécrétion par la tumeur (118,158).

De même a été affirmée la sécrétion de précurseurs : 17α-hydroxyprégnènolone et 17α-hydroxyprogestérone (191), de prégnènolone (156).

Ces techniques permettent surtout de préciser sous quelle forme -libre ou conjuguée- le stéroide est préférentiellement sécrété. Cette distinction est surtout intéressante dans le cas de la DHEA. Il faut essentiellement citer, à ce sujet, les travaux de SAEZ et coll. :

. En 1967 (158), ils mettent en évidence la sécrétion par 4 tumeurs virilisantes, de testostérone, de Δ_4-androstène-dione et de DHEA sous forme libre, ainsi que de sulfate de DHEA ; par contre, dans ce cas, l'androstérone et l'étiocholanolone aussi bien que la DHEA glycuroconjuguée ne paraissent pas être sécrétées.

. En 1969 (154), ils présentent l'observation d'une tumeur sécrétant de la DHEA sous forme libre et sulfoconjugué

mais pas de testostérone libre alors que les taux plasmatiques de ce dernier composé sont élevés ; ici, il apparaît nettement que la totalité du pool plasmatique de testostérone est formée par la conversion périphérique des précurseurs, DHEA et Δ_4-androstène-dione.

. Ils font la même constatation en 1970 (155) et 1971 (156) dans trois autres cas de corticosurrénalome virilisant : production faible de testostérone libre par la tumeur, qui sécrète essentiellement de la Δ_4-androstène-dione, l'androgénisation étant secondaire aux phénomènes d'interconversions périphériques.

D'une façon générale, les tumeurs corticosurrénaliennes sécrètent des quantités de sulfate de DHEA plus importantes que celles de DHEA libre.

Pour réunir dans une conclusion toutes ces données concernant la stéroïdogenèse des tumeurs virilisantes, nous reprendrons celle de Monsieur GUINET (70) :

La stéroidogenèse des corticosurrénalomes virilisants n'est pas fondamentalement différente des processus physiologiques l'ordonnancement est le même dans les deux cas, seul l'équilibre est rompu du fait à la fois de la surproduction hormonale et de la promotion, au rang de composés plasmatiques, de corps qui ne sont normalement que des métabolites intermédiaires.

Dans cette optique, on ne peut à proprement parler de déficit enzymatique ; les blocages observés sont apparemment

fonctionnels, par débordement de telle ou telle activité enzymatique du fait de l'inflation hormonale.

Une autre notion doit être soulignée concernant la valeur des différentes méthodes d'étude des sécrétions tumorales : pour les stéroïdes androgènes en C_{19}, le dosage des métabolites urinaires, de même que les dosages veineux périphériques isolés n'ont guère qu'un intérêt quantitatif global ; ils sont insuffisants pour affirmer la sécrétion par la tumeur d'un composé impliqué dans les phénomènes d'interconversion périphérique. Il n'en est pas de même pour leurs précurseurs en C_{21}, qui sont quantitativement beaucoup moins soumis à ces transformations ; ici l'étude des stéroïdes sanguins et urinaires garde sa valeur en faveur d'une production tumorale excessive, et surtout d'un blocage enzymatique.

IV. ETUDE DYNAMIQUE ET ASPECTS PATHOGENIQUES

A. LES DONNEES DE L'EXPLORATION FONCTIONNELLE CLASSIQUE

Elles sont parfaitement connues ; nous ne ferons que rappeler la réponse habituellement négative aux tests de stimulation par l'ACTH et de freinage par la dexamethasone qui n'influencent en rien le chiffre des 17-oxostéroïdes et des autres androgènes, plasmatiques ou urinaires. Ainsi se définit l'autonomie de la tumeur.

Bien connues également sont les nombreuses exceptions à cette règle : tumeurs stimulées par l'ACTH, freinées par la dexaméthasone, voire même réponse paradoxale du type augmentation

des 17 OS sous dexamethasone. Ces réponses "anormales" sont toujours difficiles à distinguer de l'observation d'une variation des sécrétions tumorales d'un jour à l'autre (70,76,77).

L'autonomie de ces tumeurs, et singulièrement l'absence habituelle de réponse in vivo à l'ACTH, pose un problème d'ordre pathogénique. Ce sont les études histochimiques qui réalisent une approche du fonctionnement cellulaire tumoral sous son angle dynamique, en relation avec la stéroïdogenèse.

La recherche d'une explication à l'autonomie tumorale vis-à-vis de l'ACTH a été basée sur l'étude des phénomènes qui, dans les conditions physiologiques, impliquent l'ACTH : sa liaison à la membrane cellulaire, son rôle intra-cellulaire sur les premières étapes de la stéroïdogenèse.

B. ETUDE DU MECANISME D'ACTION DE L'ACTH DANS LES TUMEURS CORTICOSURRENALIENNES : PHENOMENES MEMBRANAIRES ET INTRA-CELLULAIRES

Ce mécanisme d'action a été étudié dans le but de déceler une anomalie située soit au niveau membranaire, soit au niveau cytoplasmique.

Les travaux ont été effectués essentiellement chez l'animal, par l'obtention de lignées cellulaires indéfiniment conservées grâce à l'alternance de mises en culture et de réinjections à d'autres animaux sains (lignées de SNELL et de SATO). Des données récentes ont pu toutefois être obtenues chez l'homme par la mise en culture de cellules tumorales, c'est tout particulièrement le mérite des travaux de J.M. SAEZ.

1° Les tumeurs corticosurrénaliennes chez l'animal

a) LA LIGNEE 494 DE SNELL (171) :

La stéroïdogenèse des cellules de cette lignée en

culture n'est pas stimulée par l'ACTH.

NEY (129) a montré qu'en l'absence d'ACTH la concentration d'AMPc au niveau d'homogénats tissulaires de ces tumeurs est identique à celle de surrénales normales ; par contre, l'AMPc n'augmente pas quand les préparations sont soumises à l'action de l'ACTH. Il n'y pas, toutefois, d'accélération de la dégradation de l'AMPc, l'activité de la phosphodiestérase ayant été trouvée non augmentée. Ce même auteur observe l'absence d'augmentation de la production de corticostérone sous l'effet de l'AMPc au niveau d'incubations de tissu tumoral, contrairement à ce qui se produit dans le tissu corticosurrénalien normal.

Il y aurait donc à la fois un trouble de la formation de l'AMPc sous l'effet de l'ACTH et un défaut de réponse à l'AMPc.

SCHORR, en 1971 (163) complète ces données : il confirme l'absence de production de corticostérone par des homogénats de ces tumeurs 494 sous l'effet de l'AMPc, et, de plus, constate que l'activité adénylate-cyclase des homogénats est identique à celle d'une surrénale normale. Mais surtout il montre que cette activité adénylate-cyclase tumorale est stimulée par l'adrénaline, la nor-adrénaline et la T.S.H. (hormones normalement sans action), alors qu'elle ne l'est pas par l'angiotensine II, l'hormone anti-diurétique, le glucagon, l'insuline, la G.H., la parathormone et la thyrocalcitonine (hormones également sans effet sur la surrénale normale). Il émet ainsi l'hypothèse que LE RECEPTEUR MEMBRANAIRE A PERDU SA SPECIFICITE HORMONALE ; il y a donc une altération de l'activation, par l'ACTH, de l'adénylcyclase, bien que celle-ci soit potentiellement activable ; elle est par contre stimulable par l'effet d'autres hormones polypeptidiques.

Enfin, toujours sur cette lignée 494 de SNELL, KIMMEL, en 1974 (105), confirme l'absence de réponse à l'ACTH des cellules tumorales en culture, mais aussi l'absence de réponse au dibutyryl-AMPc.

Ainsi, dans la tumeur de SNELL, il semble exister une double anomalie :

. membranaire, d'une part, à savoir une perte de

la spécificité du récepteur à l'ACTH;

. cytoplasmique, d'autre part, soit un défaut de stimulation de la stéroïdogenèse par l'AMPc, anomalie dont le mécanisme exact ne peut toutefois être précisé.

b) LES LIGNEES TUMORALES DE SATO (22,160,193) :

Trois ont été essentiellement étudiées :

. la lignée Y_1, qui répond à l'ACTH sur le plan de la stéroidogenèse

. les lignées Y_6 et OS_3 qui ne répondent pas à l'ACTH.

KOWAL (108) a démontré que, dans les trois lignées Y_1, Y_6 et OS_3, l'AMPc stimule la stéroïdogenèse. Ceci permet donc d'exclure une anomalie située après la formation d'AMPc intracellulaire.

SCHIMMER (161,162) a précisé que le système adénylate-cyclase était présent dans les 3 lignées, et qu'il n'y avait pas d'anomalie de la dégradation de l'AMPc (activité phosphodiestérasique normale). Toutefois, ces lignées tumorales n'ont pas encore fait l'objet, à notre connaissance, d'une étude de la liaison de l'ACTH aux membranes cytoplasmiques.

Dans les lignées Y_6 et OS_3, dont la stéroïdogenèse n'est pas influencée par l'ACTH, la seule anomalie est donc très probablement située au niveau de la liaison au récepteur membranaire.

2° Les tumeurs corticosurrénaliennes humaines :

a)DONNEES IN VIVO :

L'hypothèse d'une perte de spécificité de la réponse stéroïdogénique de la tumeur peut être évoquée dans les résultats de l'exploration fonctionnelle de quelques observations. Alors que la LH n'influence pas la sécrétion des androgènes par la surrénale normale, des cas de tumeur corticosurrénalienne virilisante sensible à HCG ont été décrits : sous 5000 unités d'HCG 3 jours de suite (enassociation avec de la dexaméthasone), élévation de la

testostérone plasmatique de 800 à 3700 ng p.100 ml chez une malade castrée ayant par ailleurs des taux de LH et FSH à la limite inférieure de la normale, ce taux de testostérone n'étant pas diminué par l'administration d'éthinyl-estradiol (65). L'étude in vitro de cette même tumeur a montré que la LH augmentait, au niveau d'incubations du tissu tumoral, l'incorporation de l'acétate -^{14}C dans la prégnènolone, la progestérone, et surtout la DHEA, la Δ_4-androstène-dione et la testostérone (137). Mais aucune donnée ne concerne la réponse membranaire à LH et ACTH.

Une deuxième observation est superposable (189) : cas d'une tumeur productrice essentiellement de testostérone (sécrétion affirmée par les dosages dans le tissu tumoral), avec augmentation de la testostéronémie sous gonadotrophines chorioniques, mais également diminution par les estrogènes des taux élevés de testostérone.

b) LES ETUDES IN VITRO (145,152) :

Elles sont évidemment beaucoup plus précises. Toutefois, elles sont limitées par la durée bien plus courte de la survie des cellules tumorales (6 mois maximum dans les différentes études SAEZ).

Selon les modalités de réponse à l'ACTH et à l'AMPc, les tumeurs surrénaliennes étudiées, qui, dans tous les cas, ne répondaient pas in vivo à l'ACTH, ont pu être classées en 2 groupes :

. Pour les premières, a été démontrée une stimulation de l'activité adénylate-cyclase par la prostaglandine PGE_1. Cette stimulation est une réponse de la surrénale normale : chez l'homme, des récepteurs surrénaliens existent pour la PGE_1 et la PGE_2, probablement distincts des récepteurs spécifiques de l'ACTH (31) ; dans la surrénale de boeuf, ces récepteurs ont été également trouvés, mais ils seraient communs pour la PGE_1 et l'ACTH (159). Une liaison spécifique aux membranes surrénaliennes a d'ailleurs été démontrée également chez l'homme pour la prolactine (51) et l'insuline (153). Or, dans ce groupe de tumeurs,

l'activité adénylate-cyclase n'est pas stimulée par l'$ACTH_{11-24}$. Une liaison spécifique a toutefois été démontrée au niveau des membranes pour l'$ACTH_{1-24}$ et l'$ACTH_{11-24}$; cependant, à la différence des résultats obtenus dans le cas de la surrénale normale, l'$ACTH_{1-10}$ ne peut déplacer l'$ACTH_{1-24}$ de son site de liaison membranaire.

Aucune stimulation de l'activité adénylcyclasique n'a pu être obtenue par d'autres hormones polypeptidiques. La stéroïdogenèse des cellules tumorales en culture est stimulée par le dibutyryl-AMPc. Enfin, l'activité de la phosphodiestérase a été trouvée inférieure à celle de la surrénale normale.

Donc, dans ce groupe de tumeurs, l'anomalie siège avant la formation de l'AMPc, avec deux hypothèses possibles :

- anomalie du récepteur de l'$ACTH_{1-10}$
- anomalie du système de couplage entre l'$ACTH_{1-10}$ lié et le système adénylate-cyclase.

On ne peut véritablement parler ici de perte de la spécificité des récepteurs membranaires, puisqu'il n'y a pas de réponse à d'autres hormones polypeptidiques.

. Dans un deuxième groupe de tumeurs, une activation du système adénylate-cyclase par l'ACTH et par la PGE_1 a été obtenue. La liaison de l'$ACTH_{1-24}$ et de l'$ACTH_{11-24}$ a été trouvée identique à la liaison observée dans la surrénale normale ; dans le seul cas où cela a été étudié, l'$ACTH_{1-24}$ a été déplacé par l'$ACTH_{1-10}$. Dans les deux cas testés, le dibutyryl-AMPc n'a pas entraîné de stimulation de la stéroïdogenèse. Ici, l'anomalie siège donc au-delà de la formation de l'AMPc, ce qui fait suspecter une anomalie de la protéine-kinase.

Sans entrer dans des aspects trop technologiques, ceux-ci ayant été largement détaillés dans la thèse de RIOU (145), nous citerons les différentes hypothèses possibles concernant una anomalie de la protéine-kinase cytoplasmique dépendante de l'AMPc :

- anomalie de l'unité catalytique C (soit anomalie de l'affinité de l'ATP pour C, soit anomalie du substrat protéique à phosphoryler)
- anomalie de la liaison R-C indépendante de l'AMPc, ou anomalie

de la dissociation de R et de C par phosphorylation anormale de la sous-unité R

- anomalie de l'unité régulatrice R, en particulier anomalie biochimique intéressant la liaison AMPc - R (affinité diminuée ou augmentée rendant plus facile ou plus difficile la dissociation de la protéine-kinase).

Bien que des protocoles précis aient été établis, permettant de classer en théorie une tumeur dans l'une de ces catégories, ceci est loin d'être réalisé en pratique : les résultats obtenus sont concordants, mais souvent incomplets du fait de la lourdeur des manipulations techniques et de la nécessité de partir de cultures cellulaires, dont le temps de survie est limité. L'observation présentée en est un exemple particulièrement évident, nous le reverrons.

Dans le chapitre consacré au rappel physiologique de la régulation surrénalienne, nous avons précisé d'une part que l'AMPc n'est pas le médiateur unique de l'ACTH pour l'activation de la stéroïdogenèse et de la protéine-kinase, d'autre part que le rôle de la protéine-kinase dans la stéroïdogenèse n'est pas démontré.

Ainsi, une quelconque anomalie de la protéine-kinase ne peut de toute façon constituer qu'une hypothèse de l'origine des perturbations de la stéroïdogenèse au sein de la tumeur.

Un point obscur est l'absence de réponse in vivo à l'ACTH de tumeurs qui ne présentent aucune anomalie in vitro quant à la liaison membranaire de l'ACTH et à l'activation de l'adényl-cyclase. Deux hypothèses peuvent être soulevées :

1) l'une en relation avec une perte de spécificité membranaire, les sites de liaison de la cellule surrénalienne étant alors occupés par une autre hormone que l'ACTH ne peut déplacer.

2) l'autre fait appel aux données cinétiques comparées de l'action de l'ACTH et de l'AMPc évoquées dans le chapitre de rappel physiologique ; or la cinétique physiologique d'action de l'ACTH vis-à-vis des activités enzymatiques de la stéroïdogenèse a été retrouvée au niveau de tissus tumoraux : KOWAL (107), étudiant l'activité 11β-hydroxylase de la tumeur Y_1 de SATO, la met en évidence en l'absence d'ACTH ; cette activité n'est pas stimulée par une administration aiguë d'ACTH à des cultures longtemps privées d'ACTH ; par contre, elle sera stimulée de façon proportionnelle à la durée de cette première incubation avec l'ACTH.

Aucune preuve ne permet d'établir une relation avec ce qui se passe in vivo où la surproduction d'androgènes soustrait le tissu surrénalien non tumoral à l'action de l'ACTH.

TELLES SONT LES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES, LES UNES AFFIRMEES, LES AUTRES HYPOTHETIQUES, DES TUMEURS SURRENALIENNES VIRILISANTES.

L'intérêt des techniques biochimiques et histochimiques modernes est évident dans le but d'une précision de plus en plus grande quant à leur étude. A défaut de répondre à toutes les questions, de telles techniques permettent une approche plus fine des anomalies de la stéroïdogenèse et du primum movens du processus tumoral.

Ainsi apparaissent les insuffisances d'une étude par les moyens classiques que nous avons utilisés dans la présentation de notre observation. L'originalité de cette dernière par rapport aux données de la littérature était une raison de plus pour envisager une analyse plus approfondie.

Nous avons donc choisi de compléter l'étude de cette tumeur :

1° Les stéroïdes urinaires ont été analysés par les techniques de CGL et de CGL-SM, techniques qui paraissaient d'autant plus intéressantes à utiliser qu'elles l'avaient été récemment dans l'étude d'un corticosurrénalome virilisant tout à fait banal dans son profil sécrétoire (13,19,20). Nous avons dans notre cas étendu l'application de ces méthodes à l'analyse de trois échantillons urinaires, pour étudier plus finement l'influence tant qualitative que quantitative de la dexaméthasone et de l'ACTH. Nous avons également placé ici l'espoir de préciser le niveau non seulement de l'activité 21-hydroxylase,

mais également de l'activité 11β-hydroxylase, en nous fondant sur la bonne corrélation entre les taux sanguins et plasmatiques des stéroïdes en C_{21}.

2° Nous avons confié à l'équipe du Pr J.M. SAEZ une étude à l'échelon cellulaire, recherchant une explication du defect enzymatique dans une anomalie cellulaire en même temps qu'une relation entre l'existence d'un processus tumoral et un trouble du mécanisme d'action de l'ACTH. Là encore, nous disposons d'éléments de comparaison puisque d'autres tumeurs surrénaliennes ont été étudiées, qui ne posaient pas le problème d'un déficit enzymatique.

APPLICATION DES TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE (CGL) ET DE CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CGL-SM) A L'OBSERVATION PRESENTEE

I. PRINCIPE DES ANALYSES PAR CGL ET CGL-SM

Les principales étapes qui ont jalonné la mise au point de ces techniques sont brièvement rapportées ici.

Au XVI° siècle, le strasbourgeois BRUNSCHWIG (21) purifia de l'alcool par distillation en faisant passer la vapeur à travers une éponge imprégnée d'huile d'olive, réalisant ainsi une expérience de chromatographie gaz-liquide 440 ans avant la découverte de cette technique.

En 1856, le dijonnais DARCY (30) formula la relation établissant la vitesse d'écoulement d'un fluide dans un milieu poreux en fonction du gradient local dP/dx :

$$v = - \frac{k}{\eta} \cdot \frac{dP}{dx}$$

k = perméabilité de la colonne
η = viscosité du fluide

En 1903, TSWETT (175) décrivit la séparation des pigments colorés d'extraits végétaux par filtration sur une colonne de carbonate de calcium finement divisé ; c'est la première chromatographie.

En 1941, MARTIN et SYNGE (121) évoquèrent la possibilité de remplacer la phase mobile liquide des chromatographies jusqu'alors employées par un gaz ; ils mirent au point cette technique et en publièrent les premiers résultats expérimentaux en 1952 (94,95).

La chromatographie gaz-liquide est caractérisée par le partage des différentes vapeurs entre une phase stationnaire formée d'un mince filon liquide recouvrant les particules d'une substance neutre poreuse appelée support et une phase mobile gazeuse appelée gaz vecteur. De fait, c'est l'existence de rapports déterminés entre les pressions d'équilibre des divers corps dissous dans la phase stationnaire qui conditionne leur séparation. Cette dernière est donc indépendante de la phase mobile gazeuse, ce qui l'oppose à la chromatographie de partage en milieu liquide, dans laquelle le principde de la séparation repose sur le coefficient de partage de chaque corps dissous entre les deux phases liquides.

Parmi les facteurs inhérents à la colonne, susceptibles d'influencer la qualité de la chromatographie, nous retiendrons :

- le support, qui, idéalement, doit représenter une bonne résistance mécanique, une bonne stabilité thermique, une grande surface spécifique, une grande porosité, être inerte et n'avoir aucune adsorption vis-à-vis des solutés.

- la phase stationnaire, qui ne doit pas réagir chimiquement avec les solutés analysés et doit rester stable aux températures d'utilisation.

Le choix de la phase stationnaire, comme celui du support, présentent une importance primordiale pour le succès des analyses à effectuer ; il est en même temps guidé par la nature même des composés à analyser.

Le principe fondamental de la spectrométrie de masse découle des travaux de W.WIEN (1898) et de J.J. THOMSON (1912) lequel, utilisant un instrument à déflection magnétique, démontre l'existence de deux isotopes du néon.

Les premiers instruments précis ont été construits en 1918 (J. DEMPSTER) et 1919 (F.W. ASTON), reposant sur le principe d'un champ magnétique fixe. Ils furent utilisés pour la mesure des abondances relatives de plusieurs isotopes. Dans l'appareil d'ASTON, les ions sont recueillis sur une plaque photographique d'où le terme de "Spectrograph".

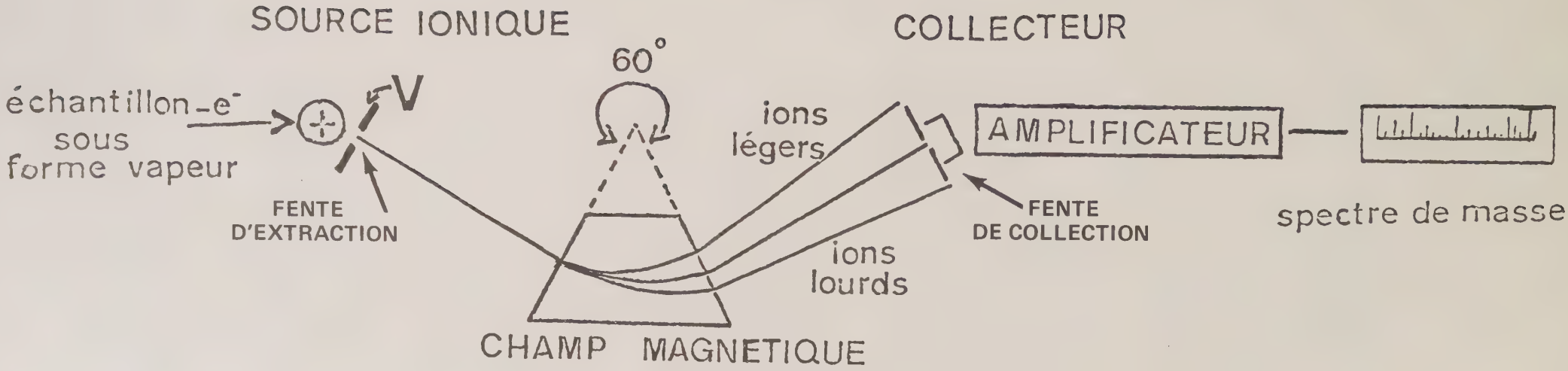
L'équation générale de la spectrométrie de masse fait intervenir le champ électrique et le champ magnétique du spectromètre de masse (fig. n°5 p.104). En effet, dans un champ électrique, l'énergie potentielle (eV) d'un ion est égale après complète accélération à son énergie cinétique ($1/2\ mv^2$) :

$$eV = \frac{1}{2} mv^2$$

Dans un champ magnétique, cet ion est soumis à deux forces en équilibre : la force centripète (HeV) et la force centrifuge (mv^2/R) :

$$HeV = \frac{mv^2}{R}$$

d'où : $$m/e = \frac{H^2 R^2}{2V}$$



$$m/e = \frac{H^2 r^2}{2V}$$

DEVIATION DES IONS SELON LEUR MASSE

FIG. N° 5

avec : m = masse de l'ion
e = charge de l'ion
v = vitesse de l'ion
V = potentiel d'accélération
H = intensité du champ magnétique
R = rayon de la trajectoire de l'ion sur le rayon de courbure.

Donc, dans le cas d'un spectromètre de masse à champ magnétique variable, la variation de ce champ détermine pour chaque ion une trajectoire dont le rayon ne dépend plus que de son rapport m/e. Ainsi, tous les ions présentant un rapport m/e différent suivent une trajectoire différente permettant leur séparation.

La spectrométrie de masse apparaît donc dans son principe comme relativement simple. Dans un premier temps, les molécules de la substance à analyser sont ionisées par bombardement électronique se traduisant par la perte d'un électron, conduisant à un ion positif appelé ion moléculaire.

$$M_o^\circ + e^- \longrightarrow M_o^+ + 2\,e^-$$

Cet ion est le précurseur de tous les autres ions formés. L'abondance et l'importance relative de chacun des ions formés sont essentiellement conditionnées par leur stabilité.

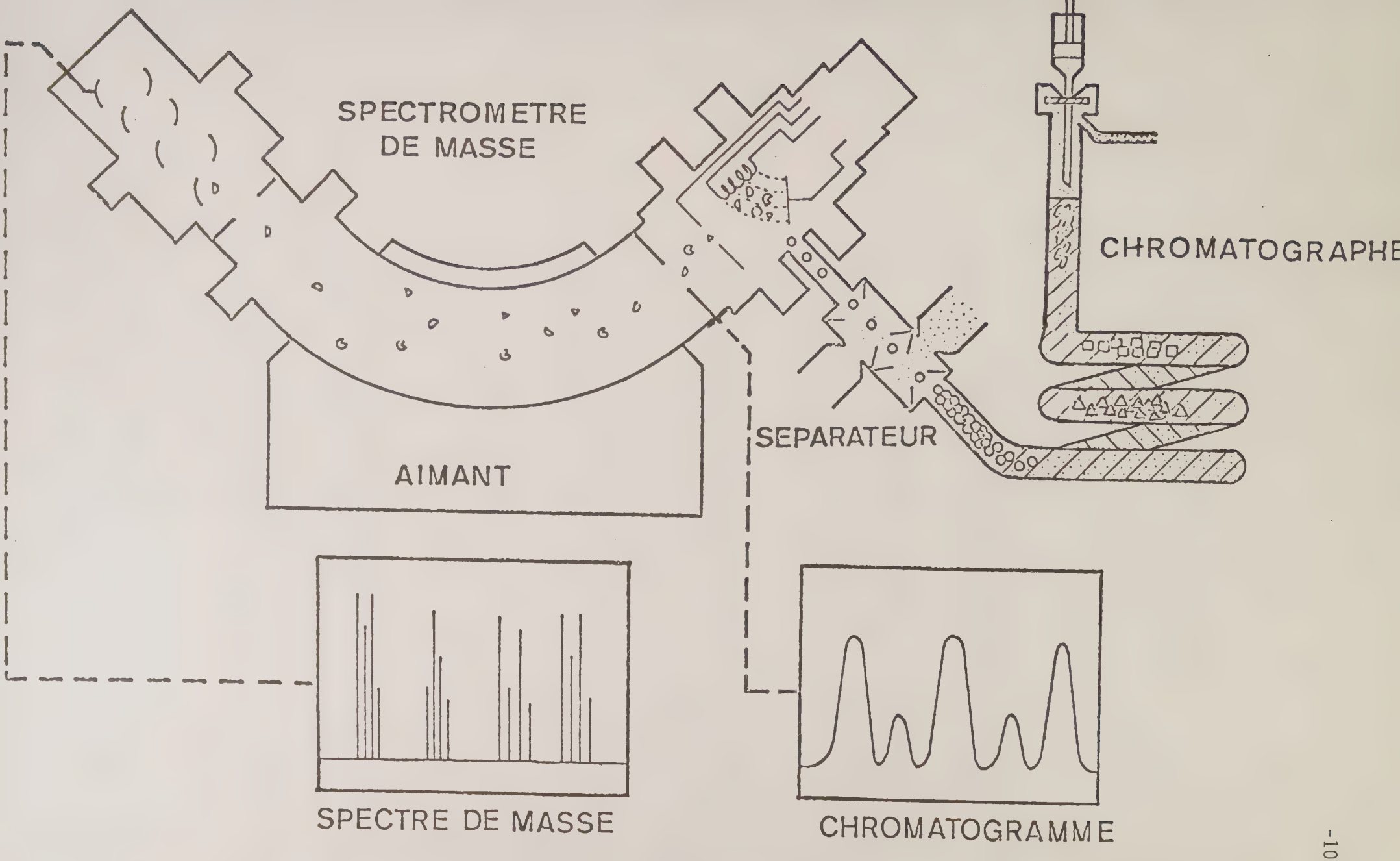
Les diverses fragmentations de l'ion moléculaire et des ions fils formés impriment à la molécule étudiée un spectre caractéristique.

En 1964 RYHAGE (150) réalise le premier couplage d'un chromatographe en phase gazeuse avec un spectromètre de

masse au moyen d'un séparateur moléculaire, permettant de soustraire la plus grande partie du gaz vecteur sortant du chromatographe, tout en respectant une fraction importante des composés séparés par la colonne chromatographique (fig. n°6 p.107). Le vide poussé nécessaire au fonctionnement correct du spectromètre de masse étant respecté, il devenait alors possible en une seule analyse de séparer et de caractériser les divers produits d'un mélange étudié.

En 1960, le premier travail concernant l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes est publié par VANDENHEUVEL et coll. (180), tandis qu'en 1961 LUUKAINEN et coll.(117), en introduisant les dérivés triméthylsilylés pour l'analyse en phase gazeuse des stéroïdes, améliorent encore les possibilités résolutives de cette méthode.

C'est en 1964 que RYHAGE et SJOVALL (151), utilisant le couplage CGL-SM, publient les premiers résultats obtenus par cette méthode dans l'analyse des stéroïdes. Cette voie sera suivie par de nombreux auteurs, mais l'application de ces méthodes à l'étude des stéroïdes urinaires dans la pathologie surrénalienne tumorale sécrétante est très limitée : nous n'en avons trouvé que deux exemples, la publication de GUSTAFSSON en 1971 (79), d'une part, le travail de R.J. BEGUE et J.M. BRUN en 1975 (13,19,20), d'autre part.



SCHEMA D'UN CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE COMBINE A UN SPECTROMETRE DE MASSE FIG. N° 6

II. MATERIEL ET METHODES

A. PRODUITS

1° Les hydrocarbures saturés (C24 et C32) proviennent de FLUKA A.G. Chemische Fabrik, CH 9470, Buchs, Suisse.

2° Les stéroïdes de référence proviennent des laboratoires Ikapharm, Ramat Gan, Israël. Le 3α-hydroxy-5β-cholestane provient des laboratoires Sigma-Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, USA.

3° Les solvants : le benzène cristallisable pour analyse, l'acétate d'éthyle pour analyse, le méthanol absolu pour analyse, l'éther diéthylique pour analyse, le chloroforme pour analyse, l'heptane pour analyse, la pyridine pour analyse, proviennent des laboratoires Merck, Darmstadt, Allemagne. L'instagel provient de Packard-Instrument Company, 3-5 rue Broussais, Paris.

4° Les solutions :

- la solution tampon acide acétique, acétate de sodium, 0,1 M, pH 5,20
- le suc digestif d'Helix pomatia (SHP) (Industrie biologique française, 35 quai du Moulin de Cage, 92 - Genevilliers) est en solution à 10 000 U./ml dans la solution tampon pH 5,20.
- la solution d'acétate de baryum pour analyse à 25% dans de l'eau distillée provient des laboratoires Merck.

5° Les réactifs :

Le silyl 8 et le N,O-bis-(triméthylsilyl)-trifluoro-acétamide (BSTFA) proviennent de Pierre Chemical CO., Rockford, Illinois, USA.

6° Les autres produits :

- le Séphadex LH-20 (granulométrie 25 à 100) provient de Pharmacie Fine Chemicals AB, Uppsala, Suède.
- le support (Supelcoport, granulométrie de 100 à 200 mesh) et la phase stationnaire utilisée (OV-1) proviennent de Supelco, Bellefonte, Pa.

B. MATERIEL

1° Les chromatographis sur Séphadex LH-20 sont réalisées en utilisant des colonnes de verre de 0,50m pour 0,7 cm de diamètre intérieur.

2° Le chromatographe utilisé est un Research Gas Chromatograph, type Becker 420 (Becker Delft N.V. Vulcanusweg 259, postbus 519, Delft, Holland) à deux détecteurs à ionisation de flamme et à deux électromètres. Il est équipé de deux colonnes en verre en W de 3,60 m pour 3 mm de diamètre intérieur. Elles sont remplies du support, imprégné au taux de 1% en poids de la phase stationnaire choisie (OV-1). Les tracés chromatographiques sont obtenus, pour chacune des deux colonnes, sur un enregistreur potentiométrique Servotrace (Sefram, 74 rue de la Libération, Paris). La vitesse de déroulement du papier est de 5 mm/mn. L'azote est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 30 ml/mn. Les autres paramètres chromatographiques seront décrits dans le chapitre METHODES.

3° Les spectres de masse des stéroïdes étudiés ont été obtenus sur un spectromètre de masse couplé à un chromatographe phase gazeuse, type LKB 9000.

C. METHODES EXPERIMENTALES

1° Préparation de l'extrait urinaire (14,33,34)

Elle a été effectuée sur une aliquote de la totalité des urines de 24 heures recueillies sur antiseptique (2 ml d'acide mercurothio-salicylique) et conservée en chambre froide à - 20°C.

a) HYDROLYSE DES STEROIDES CONJUGUES :

L'échantillon urinaire étudié a été soumis à une hydrolyse enzymatique directe et exclusive selon la méthode de JARRIGE (98) en utilisant 2000 U/ml de β-glucuronidase (solution de SHP) en procédant comme suit :

- une fraction aliquote de la diurèse des 24 heures est ajustée à pH 5,20 avec de l'acide acétique à 20%. On ajoute 1/10 en volume de tampon acétate de sodium 0,1 M, acide acétique, pH 5,20, et 3000 U/ml de β-glucuronidase.
- le mélange est laissé à 37°C pendant au moins 24 heures au bain-marie agitant.

b) Les stéroïdes libérés par l'hydrolyse sont EXTRAITS 2 fois par l'acétate d'éthyle (1:1,v/v) pendant 45 mn, puis 1 fois par l'éther diéthylique (1:1,v/v) pendant 30 mn. Les phases organiques réunies sont lavées 2 fois avec une solution molaire de bicarbonate de sodium (1:10,v/v) et 3 fois avec de l'eau distillée (1:10,v/v), chaque lavage étant effectué pendant 20 mn au tapis roulant. On vérifie que le pH du milieu soit neutre ou légèrement basique. Les phases organiques sont alors séchées sur du sulfate de sodium anhydre, avant d'être évaporées à sec à 50°C sous vide partiel. Le résidu est repris par 3 puis 2 ml de méthanol absolu, transféré dans un tube à vis, puis évaporé à sec sous courant d'azote.

2° Chromatographie sur Séphadex LH-20 (15,131)

Le résidu sec obtenu précédemment est dissous dans 1 ml du mélange chloroforme-heptane-méthanol (5:5:1,v/v) et appliqué sur une colonne contenant 6 g de Séphadex LH-20 préparé

dans le même système de solvants. L'élution des stéroïdes neutres est réalisée avec 60 ml de ce même système, et celle des stéroïdes polaires avec le mélange chloroforme-méthanol (1:2,v/v). Les fractions collectées sont évaporées à sec sous courant d'azote à 60°C.

3° Formation des éthers de triméthylsilyls (26,84,117)

Sur les résidus secs obtenus, provenant de chacune des fractions LH-20 recueillies, ces dérivés sont formés en utilisant le mélange pyridine-BSTFA (1:2,v/v) et en laissant les solutions obtenues une heure au moins à 60°C.

4° Les analyses en phase gazeuse :

a) LES ANALYSES PAR CGL sont effectuées :

- en utilisant des colonnes de 3,60 m de longueur et de 3 mm de diamètre intérieur remplies de Supelcort imprégné au taux de 1% , et conduites sur OV-1 en programmation de température de 1°C par minute, de 190°C à 250°C

- en respectant les paramètres chromatographiques suivants : débits respectifs de l'air et de l'hydrogène à 250 et 28 ml/mn, températures de la chambre d'injection et des détecteurs fixées respectivement à 260°C et 275°C. le gaz vecteur utilisé est l'azote.

b) LES ANALYSES PAR CGL-SM sont effectuées dans les mêmes conditions chromatographiques en utilisant l'hélium comme gaz vecteur. Les températures du séparateur et de la source d'ionisation sont fixées respectivement à 280°C et 300°C . l'énergie des électrons est de 22,5 eV , le courant d'ionisation étant à 60 microampères.

c) IDENTIFICATION DES STEROIDES (ANALYSE QUALITATIVE):
En chromatographie gaz-liquide, la détermination des valeurs en unité méthylène est basée sur le fait qu'en programmation de température (90,179) le temps de rétention des alcanes normaux varie linéairement en fonction de leur nombre d'atomes de carbone. La valeur en unité méthylène (UM) d'un carbure à n atomes de carbone étant arbitrairement prise comme égale à n, celle d'un

stéroïde donné s'obtient par interpolation linéaire entre 2 carbures respectivement à n et n + 4 atomes de carbone, l'encadrant au plus près sur le chromatogramme. La valeur en UM d'un stéroïde étudié X est égale à

$$n + \frac{4 \,/\, d\,(X) - d\,(n)}{d\,(n+4) - d\,(n)}$$

d(X), d (n) et d (n + 4) représentant respectivement les distances de rétention corrigées du volume mort de stéroïde étudié, du carbure à n atomes de carbone, et du carbure à (n + 4) atomes de carbone.

La comparaison de l'UM ainsi calculée à celle de stéroïdes connus permet en général d'affirmer par CGL l'identité du pic obtenu. L'identification des composés chromatographiés est obtenue par comparaison de leur spectre de masse avec ceux obtenus pour les stéroïdes de référence.

d) ANALYSE QUANTITATIVE :

Elle nécessite, dans un premier temps, le calcul du rendement d'extraction, puis la détermination, pour chaque stéroïde de l'échantillon biologique, d'un coefficient de réponse par la méthode de l'étalonnage interne (34).

L'expression finale des résultats est donnée dans la relation suivante :

$$Q = \frac{1}{X} \times \frac{h_s}{h_{EI}} \times Q_{EI} \times \frac{1}{R_t} \times 10^{-3}$$

avec Q = quantité de stéroïde excrété (mg/24h)

X = fraction de la diurèse

h_s = hauteur du pic du stéroïde étudié

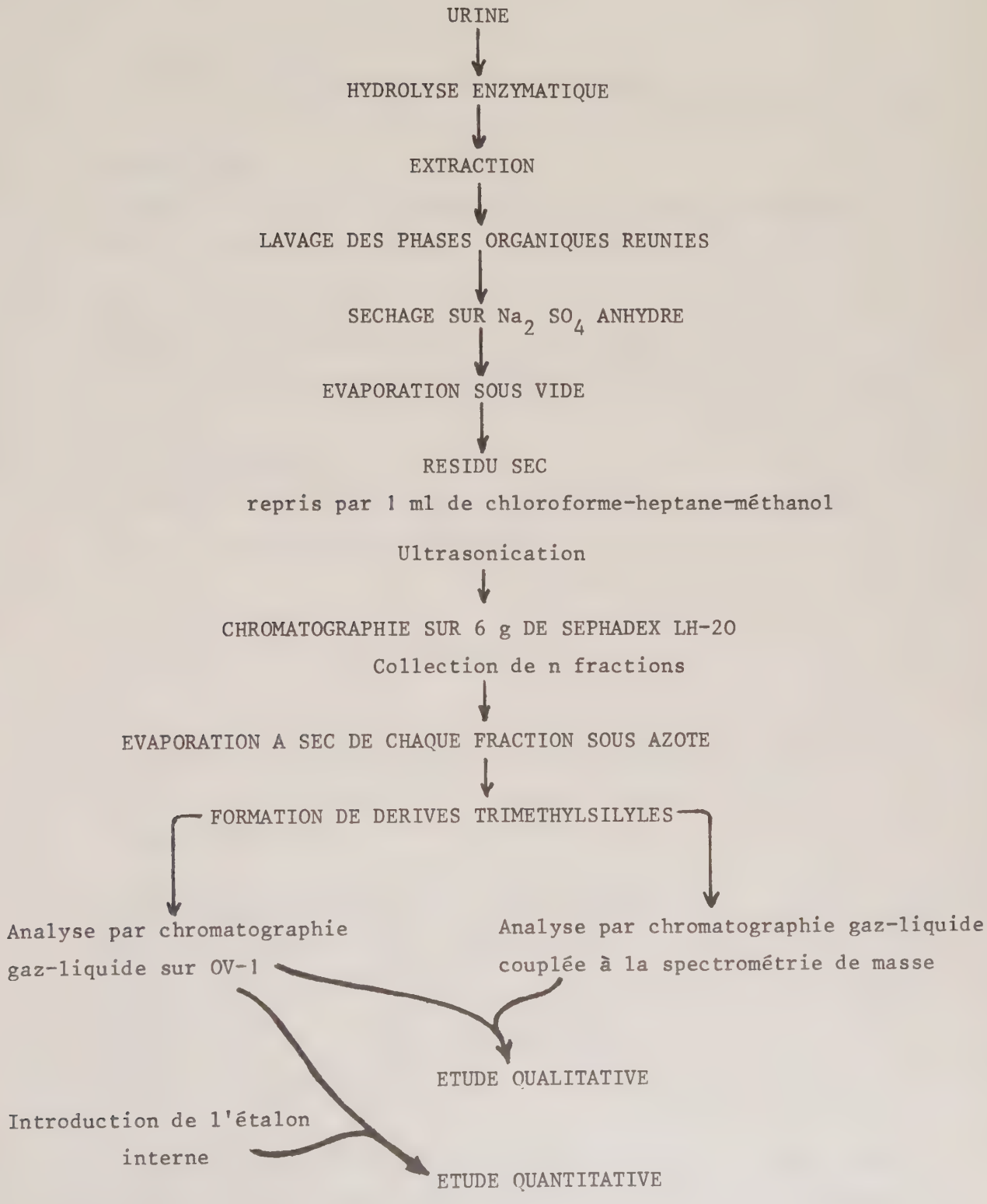
h_{EI} = hauteur du pic de l'étalon interne

Q_{EI} = quantité d'étalon interne ajoutée (µg)

R_t = rendement d'extraction (valeur moyenne = 80%)

L'ensemble des manipulations effectuées est résumé p.113.

SCHEMA GENERAL DE LA METHODE D'ANALYSE UTILISEE



III. RESULTATS

Les échantillons urinaires étudiés sont les suivants :

URINES TEMOIN

Diurèse du 1 au 2/7/74 (correspondant à la diurèse témoin du test de JAYLE)

URINES SOUS DECTANCYL

Diurèse du 1 au 2/8/74 (après 3 jours d'administration de dexaméthasone à raison de 8 mg par jour)

URINES SOUS ACTH

Diurèse du 6 au 7/9/74 (urines recueillies le jour de la perfusion de 25 mg d'ACTH sur 8 heures).

A. ETUDE QUALITATIVE

Les manipulations ont été effectuées sur des aliquotes d'urine homogénéisée Δ calculées pour obtenir une quantité voisine de 17-oxo-stéroïdes à analyser, comme le montre le tableau ci-dessous :

ECHANTILLON	DIURESE (ml)	17 OS (mg/24h)	Δ	17 OS(mg/Δ)
Témoin	750	18,00	1/10	1,8
Dectancyl	1350	29,30	1/15	1,8
ACTH	1600	18,88	1/10	1,9

Dans les trois cas, après hydrolyse par le SHP, chaque extrait urinaire a été soumis à une chromatographie sur Séphadex

LH-20 : les fractions ont été recueillies de la manière suivantes :

DANS LE PREMIER SYSTEME (chloroforme-heptane-méthanol) :

- pour les urines témoin, 12 fractions de 5 ml (f.1 à f.12)
- pour les urines sous Dectancyl, 11 fractions de 5 ml (f.1 à f.11), 1 fraction de 50 ml (f.12) et 2 fractions de 10 ml (f.13 et f.14)
- pour les urines sous ACTH, 11 fractions de 5 ml (f.1 à f.11), 1 fraction de 80 ml (f.12) et 2 fractions de 10 ml (f.13 et f.14)

DANS LE DEUXIEME SYSTEME (chloroforme-méthanol) :
Recueil de 5 fractions de 10 ml (f.13 à f.17) et de 1 fraction de 25 ml (f.18) pour les urines témoin ; ces fractions n'ayant amené l'élution d'aucun stéroïde, ce deuxième système n'a pas été utilisé pour les 2 autres échantillons urinaires.

Dans les pages suivantes, sont reproduits les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse par CGL des fractions suivantes :
URINES TEMOIN : f. 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9
URINES SOUS DECTANCYL : f. 3, 4, 5, 6 et 7
URINES SOUS ACTH : f. 3, 4, 5, 6, 7, 8 à 11, 12 à 14 (fractions regroupées dans le cas de ces 2 derniers chromatogrammes).

Les stéroïdes identifiés dans chaque fraction y figurent sous la forme de pics chromatographiques repérés par leur valeur en UM. Pour ne pas surcharger ces figures, nous n'avons pas reproduit les pics des hydrocarbures saturés de référence C24 et C32.

Nous ne présentons pas les chromatogrammes des autres fractions : en effet, les fractions 1+2 des trois échantillons comportent exclusivement l'élution du cholestérol. Les autres fractions (f. 10 à 18 des urines témoin, f. 8 à 11 des urines sous Dectancyl) présentaient des pics chromatographiques dont l'étude

par spectrométrie de masse a affirmé la nature non stéroïdienne. La fraction 12 des urines sous Dectancyl comportait exclusivement l'élution d'une trace de β-cortol (composé n° 56).

Pour chaque fraction, nous avons placé en regard les résultats de l'identification, par spectrométrie de masse, des pics chromatographiques.

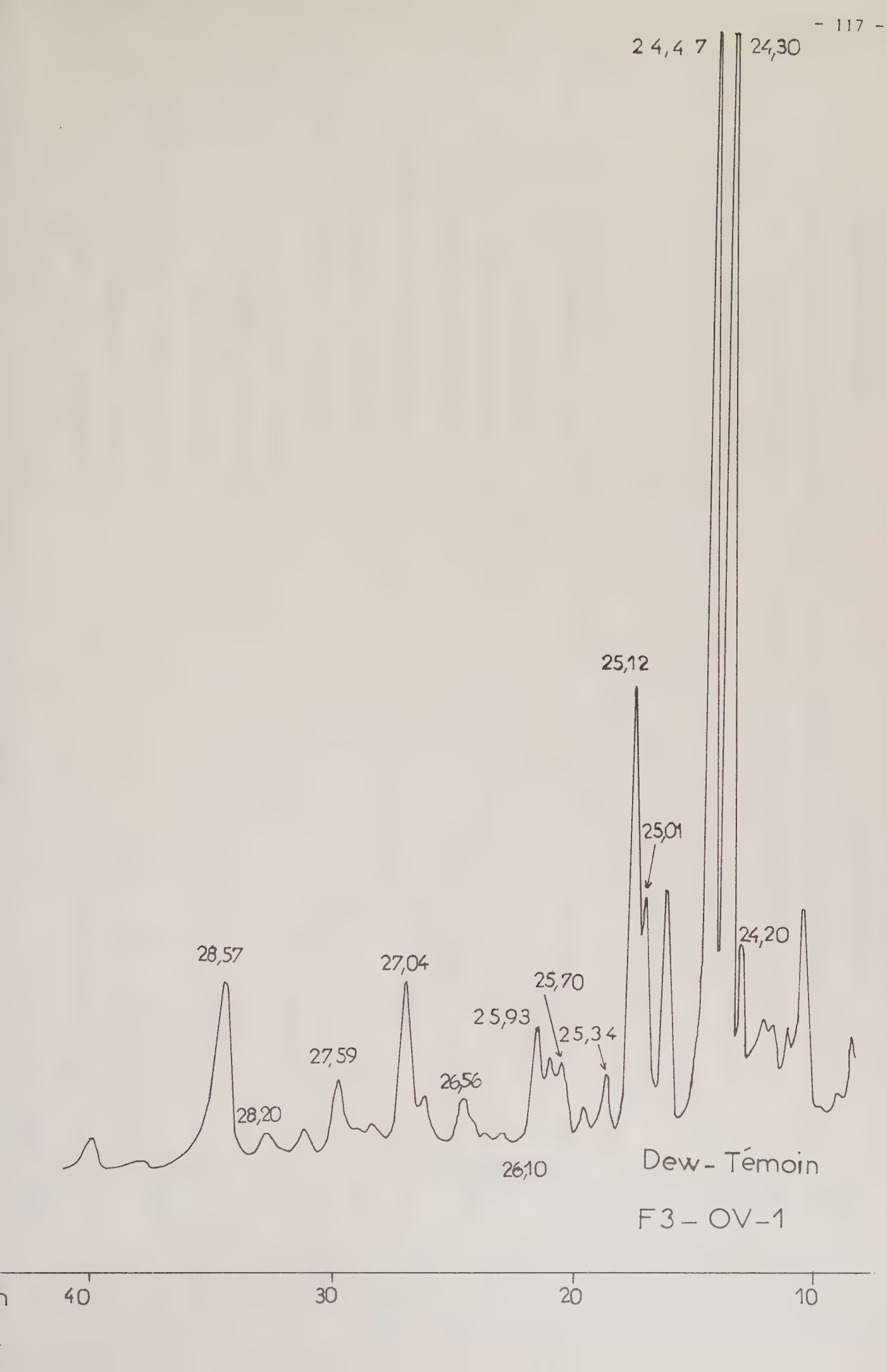
Après cette série de chromatogrammes, sont présentés, avec leur interprétation, les spectres de masse de la plupart des composés, ainsi que le spectre de masse de quelques pics correspondant à l'élution simultanée de plusieurs composés.

La numérotation adoptée traduit, pour l'ensemble des stéroïdes identifiés, leur ordre d'élution. Les exceptions sont représentées par les produits n° '8, '12, '18, '19, et '49 ainsi repérés, dont la silylation ne se fait pas selon un mode unique, si bien qu'un même produit est élué à 2 UM différentes. Nous l'avons alors numéroté selon son élution la plus précoce. Nous reviendrons d'ailleurs sur cet aspect intéressant de notre travail.

Afin de permettre une meilleure compréhension de l'identification d'un composé par son spectre de masse, nous avons reproduit deux schémas de fragmentation dans les pages situées en regard des p. 146 et 167, respectivement pour les produits comportant une fonction 20-hydroxy-21-desoxy et ceux hydroxylés en 20 et 21.

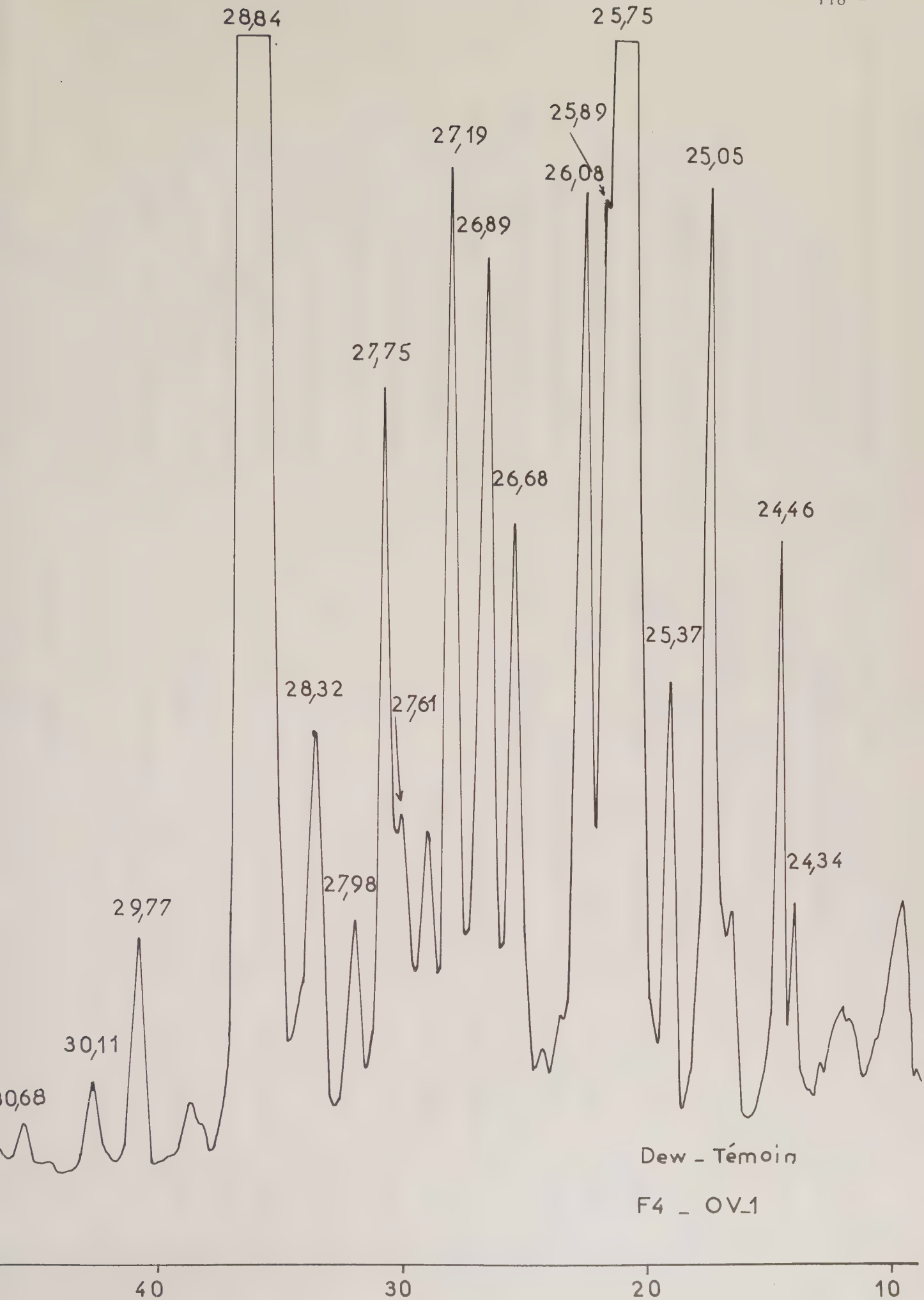
N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
2	24,20	362	108-129-155-215-257-272-347-362	3β-hydroxy-5β-androstan-17-one
3	24,25	360	129-231-255-270-304-360	3α-hydroxy-5-androsten-17-one
4	24,30	362	108-129-130-155-215-233-244-257-271-272-305-306-347-362	3α-hydroxy-5α-androstan-17-one
5	24,47	362	108-129-176-215-244-257-272-347-362	3α-hydroxy-5β-androstan-17-one
7	25,01	434	143-239-329-419-434	4-androstène-3ξ,17ξ-diol
9	25,12	390	215-230-300-375-390	3α-hydroxy-5β,17α-prégnan-20-one
10	25,34	462	117-129-282-372-447-462	5-prégnène-3α,20ξ-diol
*8	25,70	448	304-343-358-433-448 (énol-TMS)	3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione
*18	25,93	478	215-255-345-435-478	3α,17α-dihydroxy-5β-pregnan-20-one
*19	26,10	450	156-184-270-360-435-450	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
20	26,56	450	143-270-435-450	3α,15α-dihydroxy-5α-androstan-17-one
26	27,04	464	117-449-464	5β-prégnane-3α,20α-diol
32	27,59	462	117-129-372-447-462	5-prégnène-3β,20β-diol
40	28,20	550	117-129-141-156-157-460	5-prégnène-3α,16α,20α-triol
43	28,57	480	255-273-435	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol

TEMOIN : FRACTION N° 3


24,47
24,30
25,12
25,01
24,20
28,57
27,04
25,70
25,93
25,34
27,59
26,56
28,20
26,10
Dew - Témoin
F3 - OV-1
40
30
20
10

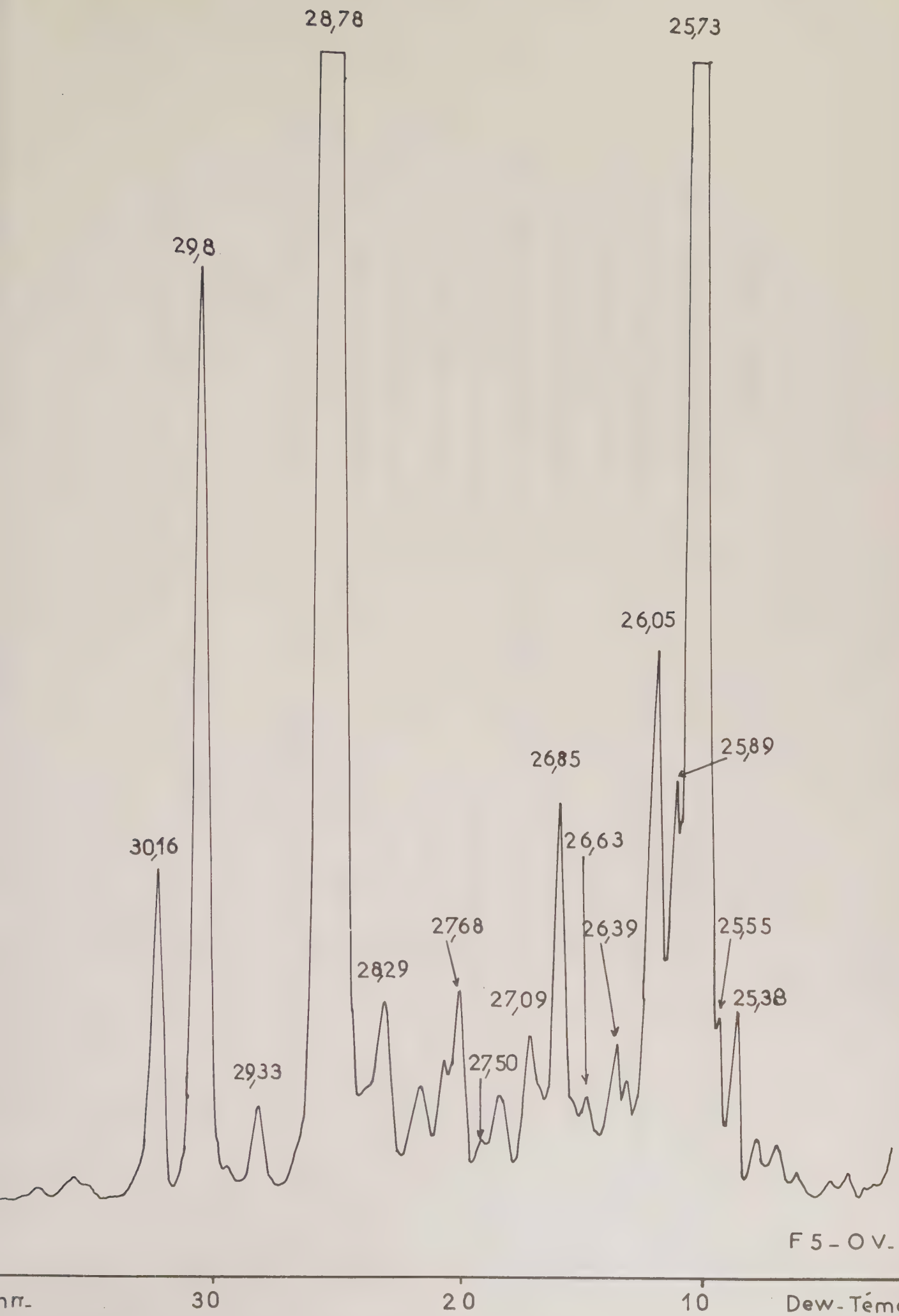
N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
4	24,34	362	108-129-130-155-215-233-244-257-271-272-305-306-347-362	3α-hydroxy-5α-androstan-17-one
5	24,46	362	108-129-176-215-244-257-272-347-362	3α-hydroxy-5β-androstan-17-one
*8	25,05	376	129-131-232-271-286-361-376	3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione
10	25,37	462	117-129-372-447-462	5-prégnène-3α,20ξ-diol
11		450	242-270-354-360-435-450	3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one
*12	25,70	376	117-129-131-142-143-195-271-304-347-376	3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione
*12	25,75	448	304-343-358-433-448	3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione (énol-TMS)
17		450	270-360-435-450	3α,7α-dihydroxy-5β-androstan-17-one
*19	25,89	378	288-363-378 (non silylée en 11)	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
13		448	199-214-304-358-433-448	3α,16α-dihydroxy-5-androsten-17-one
*18	26,02	478	215-255-345-435-478	3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one
*19	26,08	450	156-184-199-270-360-450	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
23	26,68	450	143-270-360-435-450	3α,15α-dihydroxy-5β-androstan-17-one
24	26,89	464	117-359-449-464	5α-prégnane-3α,20α-diol
26	27,19	464	117-449-464	5β-prégnane-3α,20α-diol
35	27,75	462	117-129-372-447-462	5-prégnène-3β,20α-diol
37	27,98	566	117-566	X,Y,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-mono-one
40	28,32	550	117-129-141-156-157-460	5-prégnène-3α,16α,20α-triol
41		480	255-273-390-465-480	5ξ-prégnane-3α,17α,20β-triol
43	28,84	480	255-273-435	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol

TEMOIN : FRACTION N ° 4


28,84
25,75
25,89
27,19
26,08
25,05
26,89
27,75
26,68
24,46
25,37
28,32
27,61
27,98
24,34
29,77
30,11
0,68
Dew - Témoin
F4 _ OV_1
40
30
20
10

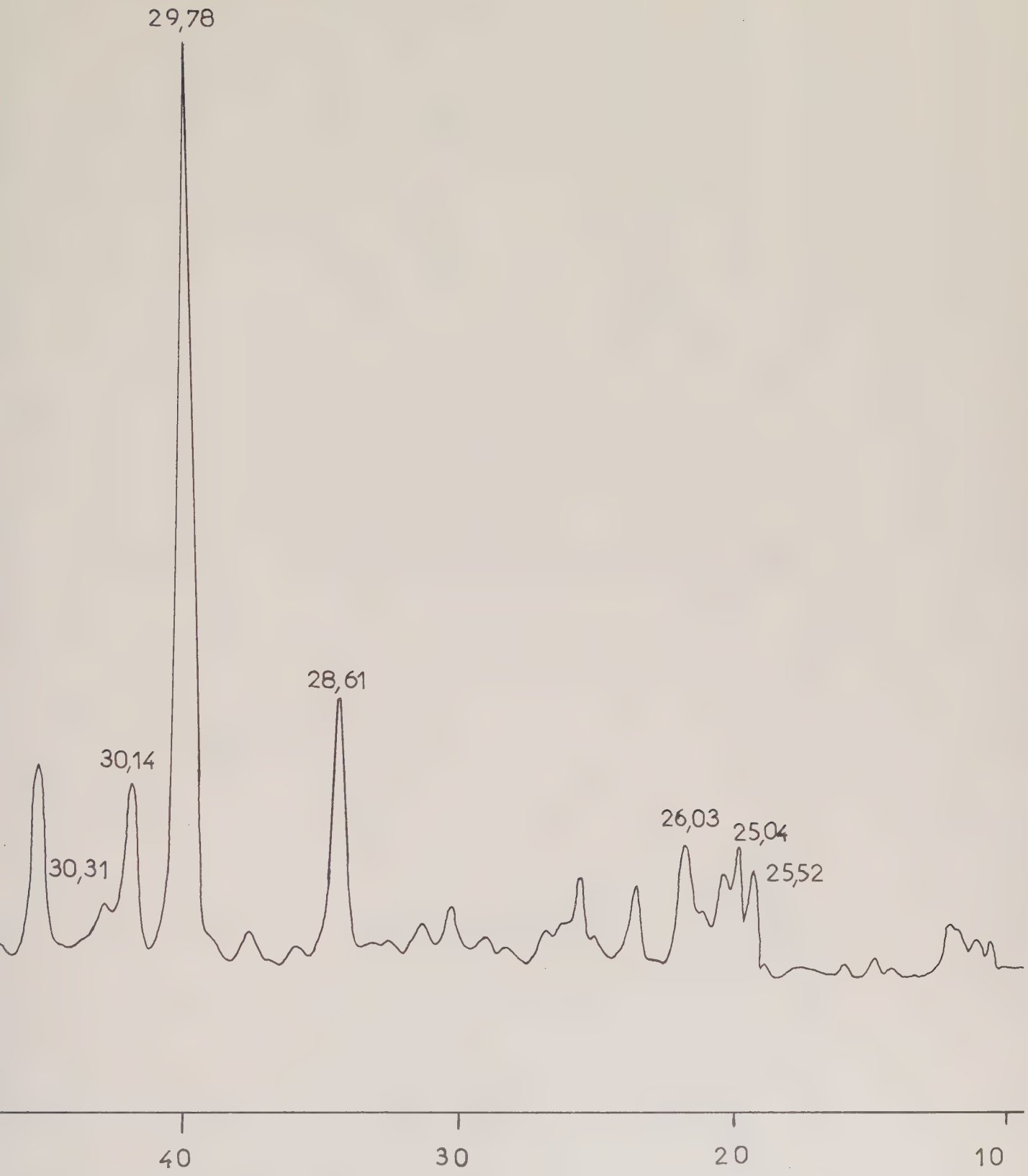
N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
11	25,38	450	270-345-360-435-450	3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one
*12	25,55	376	117-129-131-142-143-195-271-304-347-376	3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione
17	25,73	450	270-360-450	3α,7α-dihydroxy-5β-androstan-17-one
*19		378	288-363-378 (non silylé en 11)	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
*18	25,89	478	215-255-345-435-478	3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one
*19	26,05	450	156-184-199-270-360-450	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
22	26,39	450	108-156-157-184-270-360-394-450	3α,11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one
23	26,63	450	143-270-435-450	3α,15α-dihydroxy-5β-androstan-17-one
24	26,85	464	117-269-359-449-464	5α-prégnan-3α,20α-diol
26	27,09	464	117-284-374-449-464	5β-prégnan-3α,20α-diol
31	27,50	478	215-255-345-435	3β,17α-dihydroxy-5α-prégnan-20-one
35	27,68	462	117-129-372-447-462	5-prégnène-3β,20α-diol
40	28,29	550	117-129-141-156-157-445-460-535-550	5-prégnène-3α,16α,20α-triol
43	28,78	480	255-273-435	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol
*49	29,83	494	117-287-404-479-494 (non silylée en 17)	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one
53	30,16	478	117-129-253-271-343-433-478	5-prégnène-3ξ,17α,20ξ-triol

TEMOIN : FRACTION N° 5


28,78
25,73
29,8
26,05
25,89
26,85
30,16
26,63
27,68
26,39
25,55
28,29
27,09
25,38
29,33
27,50
F 5 - O V - 1
nm-
30
20
10
Dew - Témoin

N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
11	25,52	450	242-270-345-360-435-450	3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one
15	26,03	450	129-147-169-216-255-306-345-360-435-450	3ξ-X-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one
43	28,61	480	255-273-435-480	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol
45		552	269-359-449-552	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21--triol
49	29,78	494	117-287-404-479-494 (non silylée en 17)	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one
51	29,85	478	253-271-343-433-478	5-prégnène-3ξ,17α,20ξ-triol
52	30,14	552	117-269-359-449	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol
54	30,31	478	117-253-271-478	5-prégnène-3ξ,17α,20ξ-triol
55		552	359-361-449	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol

TEMOIN : FRACTION N° 6

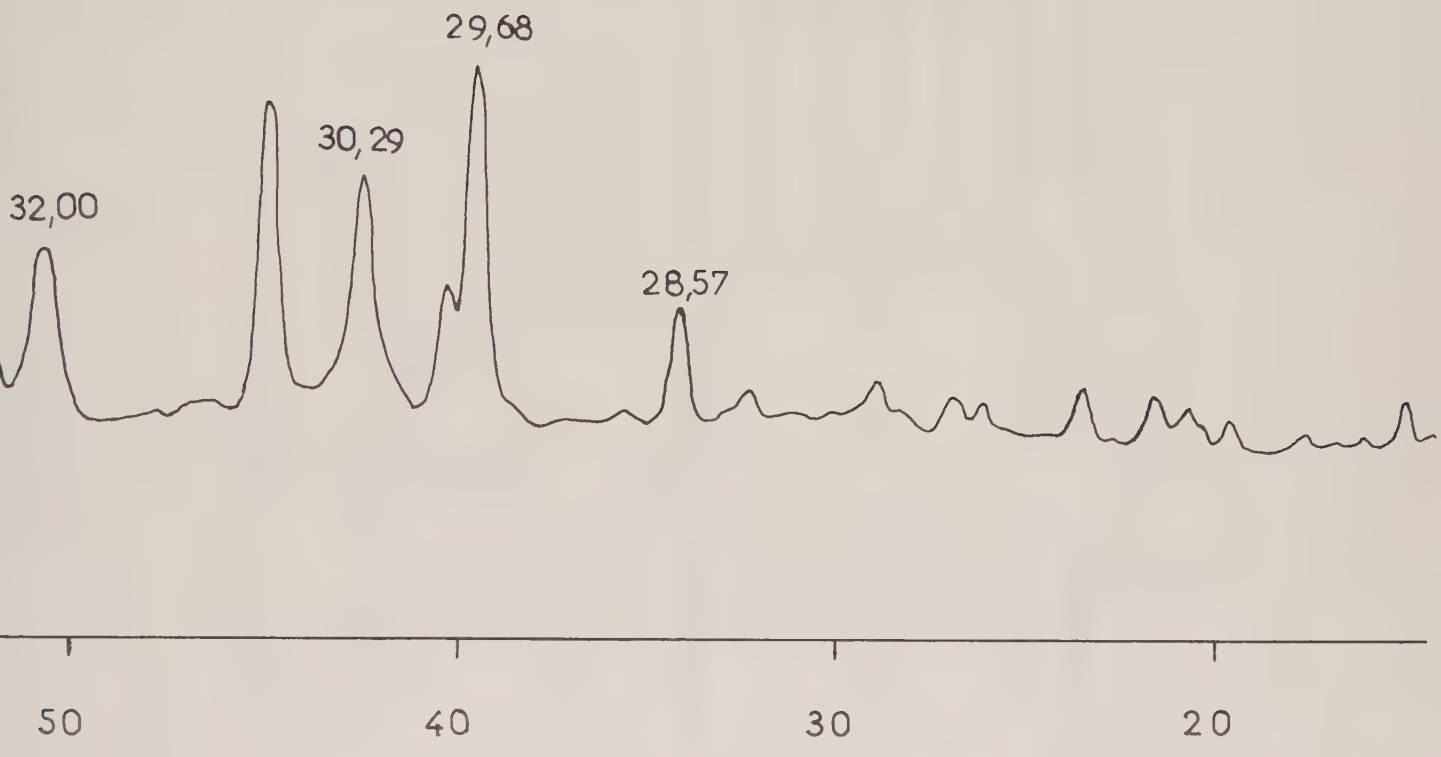


Dew - Témoin

F 6 - OV-1

N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
43	28,57	480	255-273-435	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol
44		566	117-269-359-449	3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one
49	29,68	494	117-287-404-479-494	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one (non silylée en 17)
52	30,18	552	117-269-359-449-552	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol
54	30,29	478	117-253-271-361	5-prégnène-3ξ,17α,20ξ-triol
55		552	359-361-449	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol
56	32,00	656	116-205-253-360-450-566	5β-prégnane-3α,11β,17α,20β,21-pentol (β-cortol)
57		566	117-269-359-449-566	3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11one

TEMOIN : FRACTION N° 7



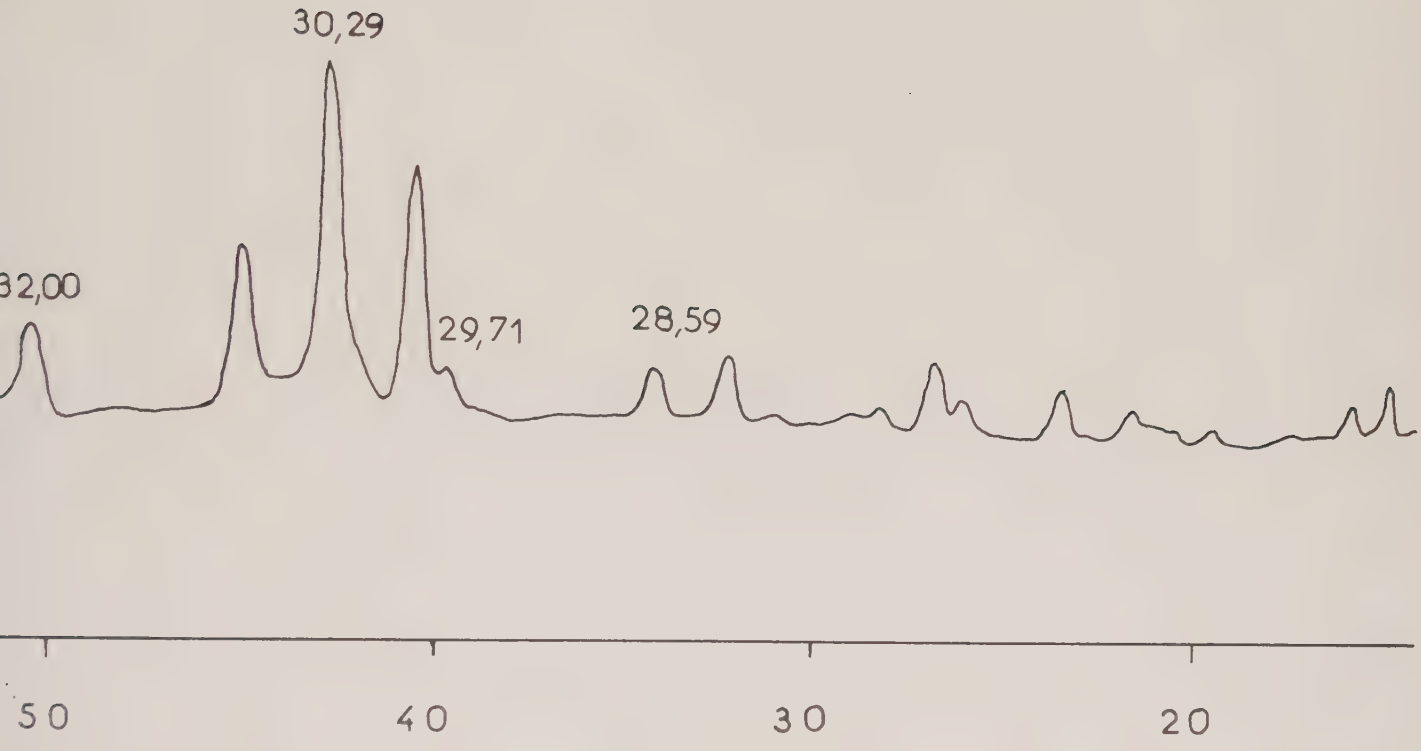
Dew — Témoin

F7 - OV-1

N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
43	28,59	480	255-273-435	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol
44		566	117-269-359-449-566	3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one
49	29,71	494	117-287-404-479-494 (non silylée en 17)	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one
54	30,29	478	117-253-271-361-478	5-prégnène-3ξ,17α,20ξ-triol
55		552	359-361-449	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol
56	32,00	656	116-201-205-253-270-343-360-433-450-476-523-566	5β-prégnane-3α,11β,17α,20β,21-pentol (β-cortol)
57		566	117-269-359-449-566	3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one

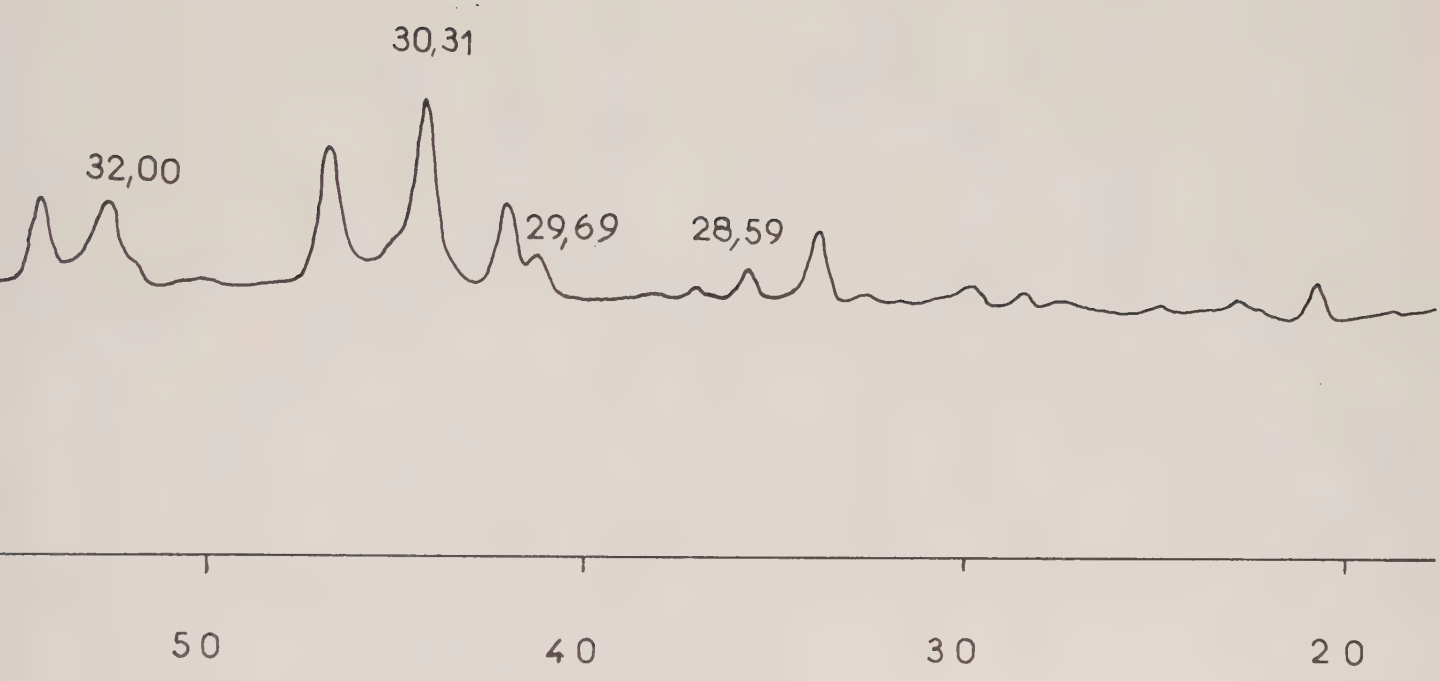
TEMOIN : FRACTIONS N° 8 ET 9

(Les UM indiquées sont celles de la fraction n° 8)



Dew - Témoin

F8 - OV-1



Dew — Témoin

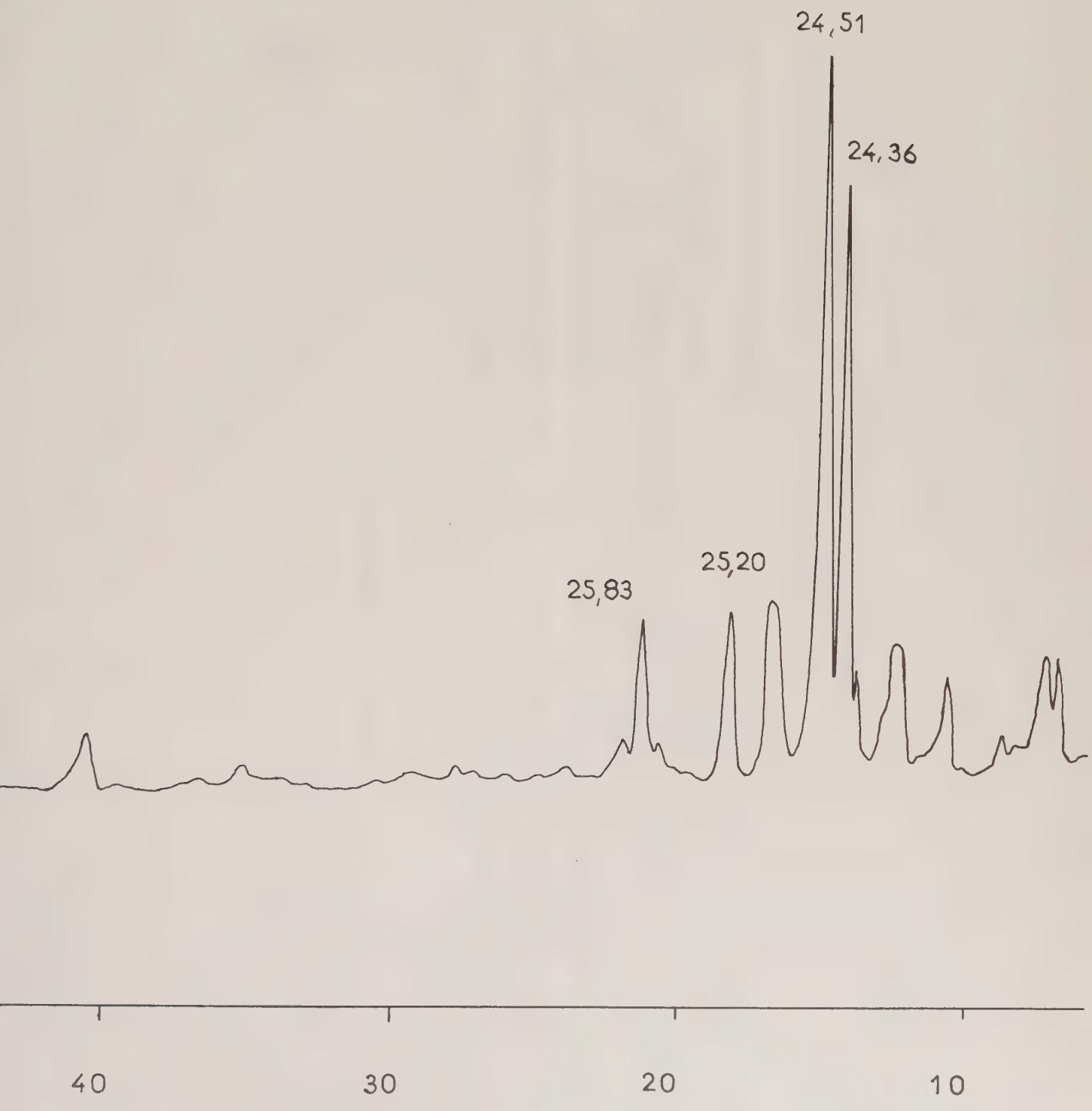
F9 - OV-1

N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
4	24,36	362	108-129-130-155-215-233-244-257-271-272	3α-hydroxy-5α-androstan-17-one
5	24,51	362	108-129-176-215-244-257-272-347-362	3α-hydroxy-5β-androstan-17-one
6	24,91	524	143-169-239-329-419-434	5ξ-androstane-3ξ,11β,17ξ-triol
9	25,20	390	215-230-300-375-390	3α-hydroxy-5β,17α-pregnan-20-one
8	25,83	448	304-343-358-433-448 (énol-TMS)	3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione
16		450	201-216	3α,16α-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one

DECTANCYL : FRACTION N° 3

Dew - DECT.

F3 - OV-1

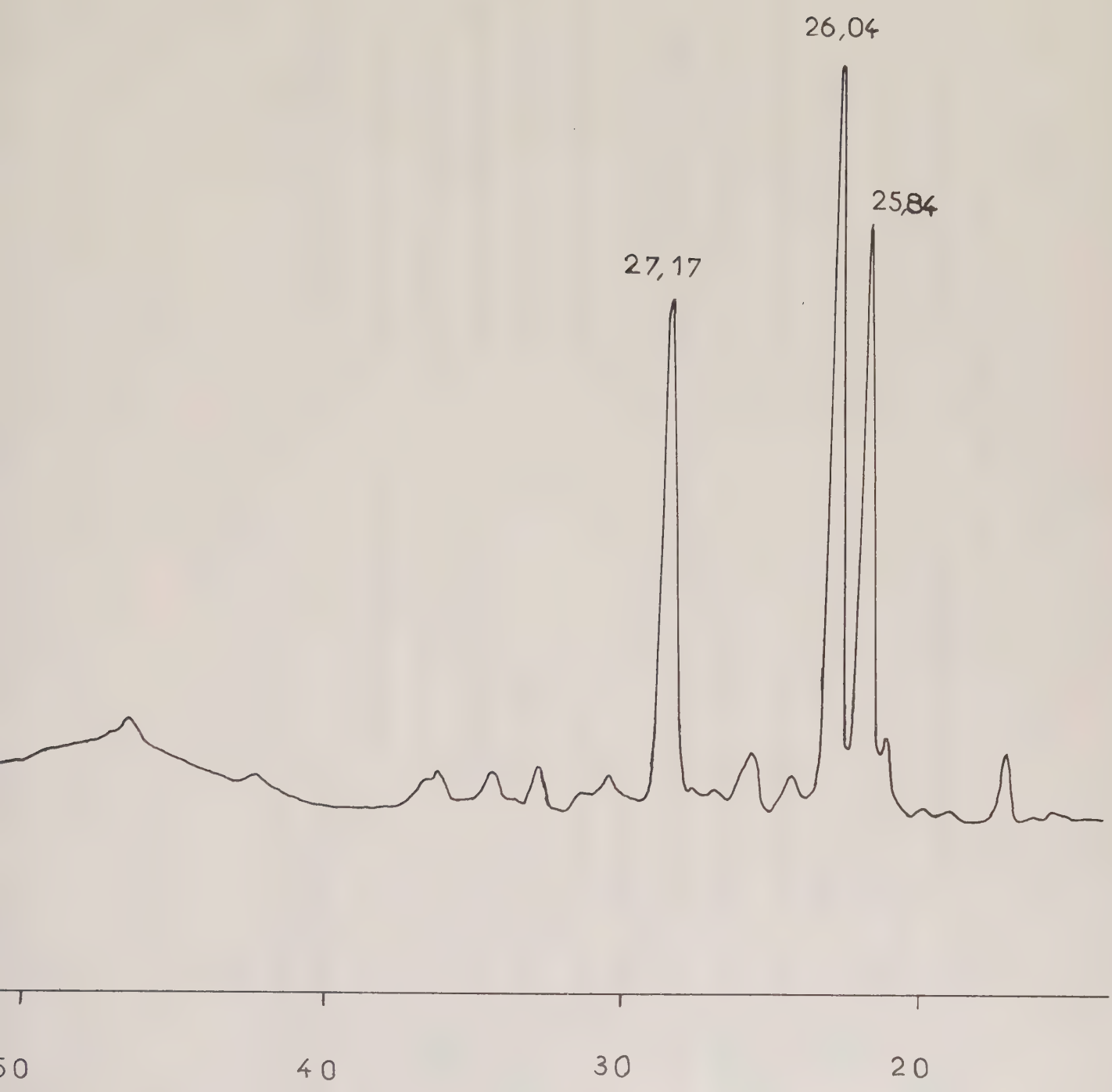


N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
°8	25,10	376	232-271-286-361-376	3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione
°12	25,84	448	304-343-358-433-448	3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione (énol-TMS)
°18	26,04	478	215-255-345-435-478	3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one
26	27,17	464	117-359-449	5β-prégnane-3α,20α-diol

DECTANCYL : FRACTION N° 4

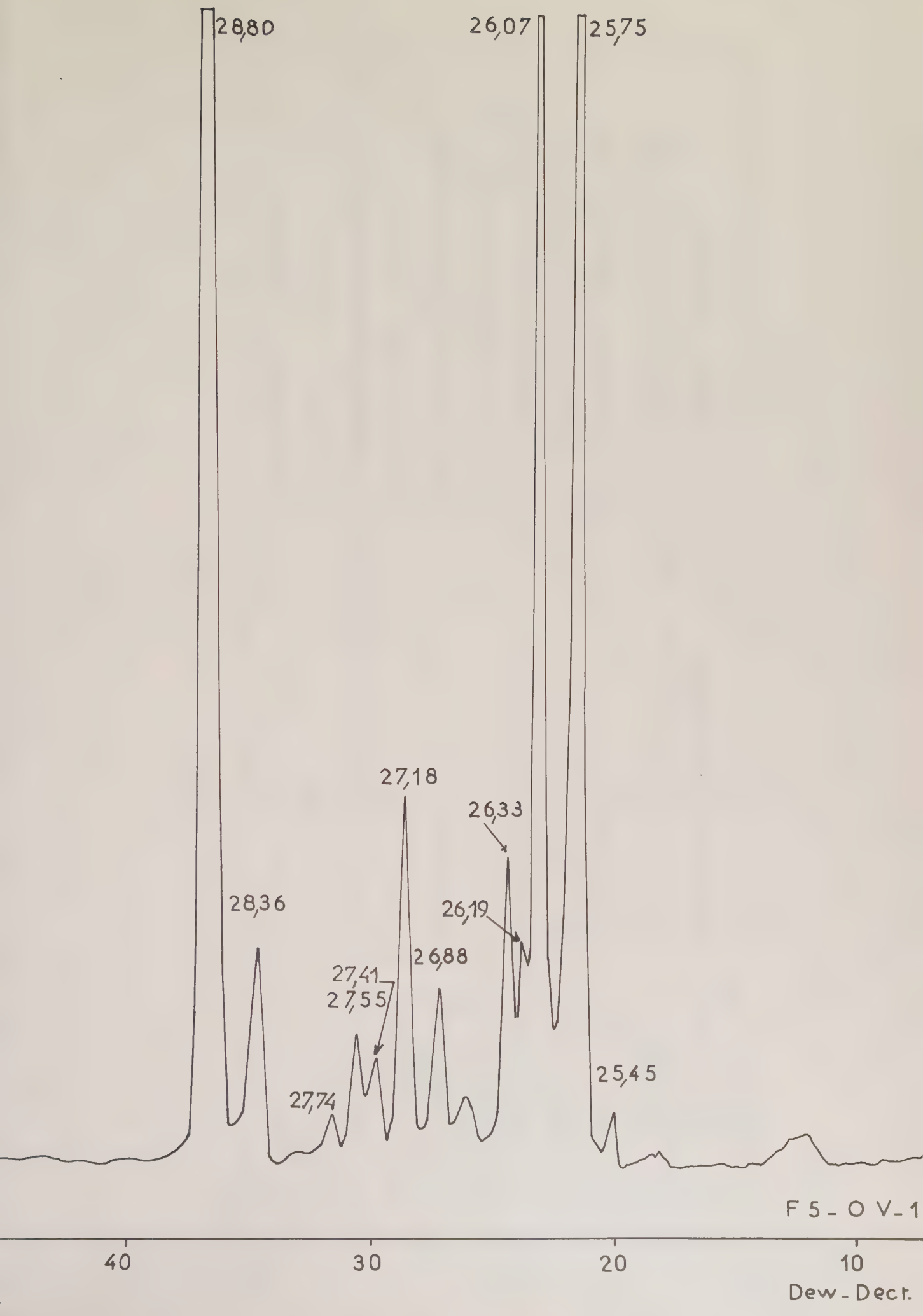
Dew DECT.

F4 OV 1



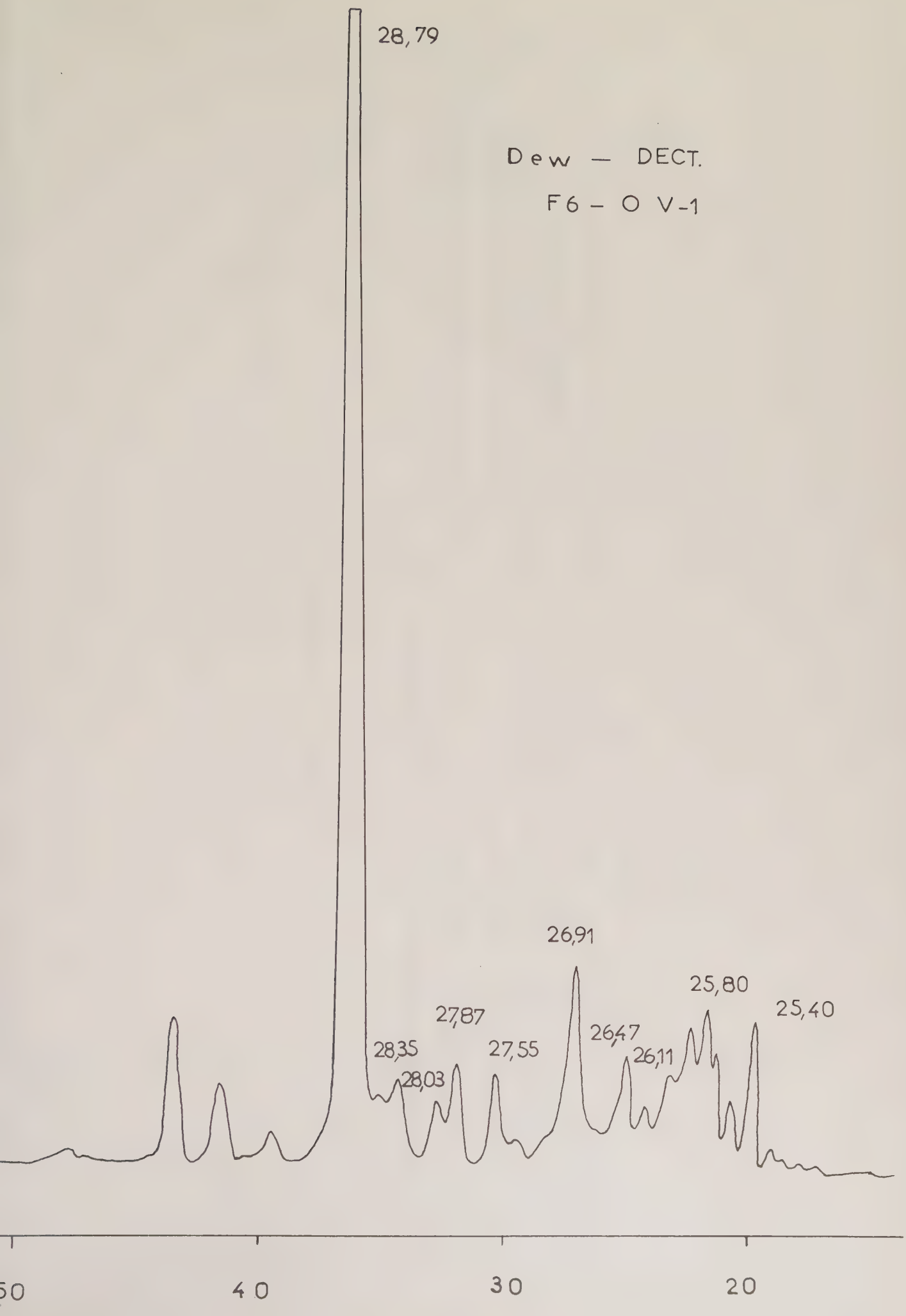
N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
17	25,75	450	270-360-435-450	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
·19		378	288-363-378 (non silylée en 11)	3α,7α-dihydroxy-5β-androstan-17-one
·18	26,07	478	215-255-345-435-478	3α,17α-dihydroxy-5β-pregnan-20-one
·19	26,19	450	156-184-199-270-360-450	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
·18	26,88	550	117-230-231-242-243-550 (énol-TMS)	3α,17α-dihydroxy-5β-pregnan-20-one
26	27,18	464	117-449-464	5β-prégnane-3α,20α-diol
29	27,41	478	96-109-172-186	3α,16α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one
31	27,55	478	215-255-345-435-478	3β,17α-dihydroxy-5α-prégnan-20-one
34	27,74	448	129-199-214-304-343-433-448	3β,16α-dihydroxy-5-androsten-17-one
35		462	117-129-282-372-447-462	5-prégnène-3β,20α-diol
40	28,36	550	117-129-141-156-157-445-460-535-550	5-prégnène-3α,16α,20α-triol
43	28,80	480	255-273-435	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol

DECTANCYL : FRACTION N ° 5


28,80
26,07
25,75
27,18
26,33
28,36
26,19
26,88
27,41
27,55
27,74
25,45
F 5 - O V - 1
40
30
20
10
Dew - Decr.

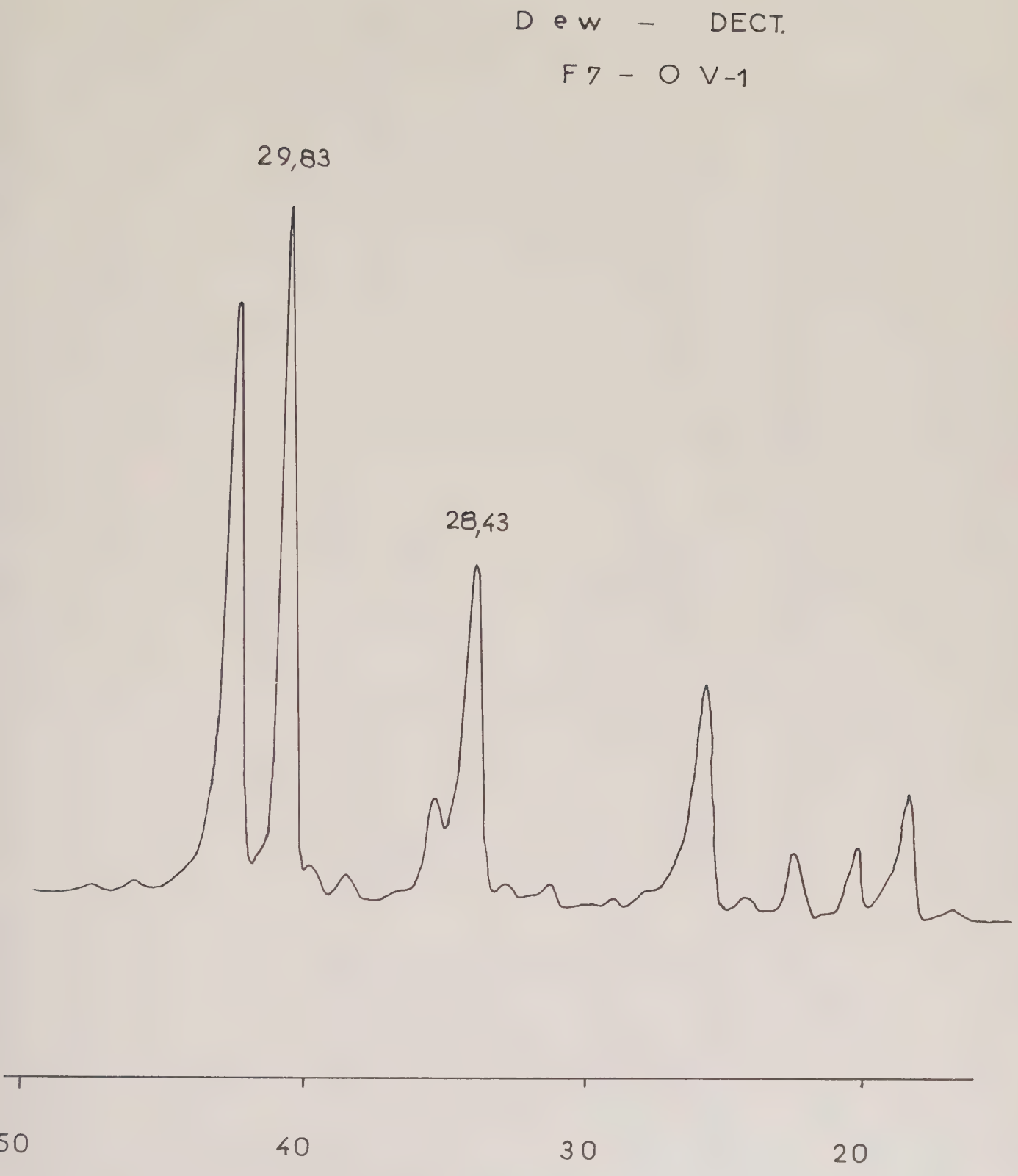
N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
11	25,40	450	270-345-360-435-450	3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one
14	25,80	450	129-270-345-360-450	3ξ,X-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one
19	26,11	450	156-184-199-270-360-394-450	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
22	26,47	450	108-156-157-184-270-360-394-450	3α,11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one
25	26,91	566	269-359-449	3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one
31	27,55	478	215-255-345-435	3β,17α-dihydroxy-5α-prégnan-20-one
36	27,87	566	253-343-433-523-566	trihydroxy-prégnan-mono-one
38	28,03	566	117-129-149-156-157-218-219-231-448-538-566	trihydroxy-prégnan-mono-one
39	28,35	552	117-141-156-157-462	5α-prégnane-3α,16α,20α-triol
43	28,79	480	255-273-435	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol

DECTANCYL : FRACTION N ° 6


28,79
Dew — DECT.
F6 – O V-1
26,91
25,80
25,40
27,87
26,47
28,35
27,55
26,11
28,03
50
40
30
20

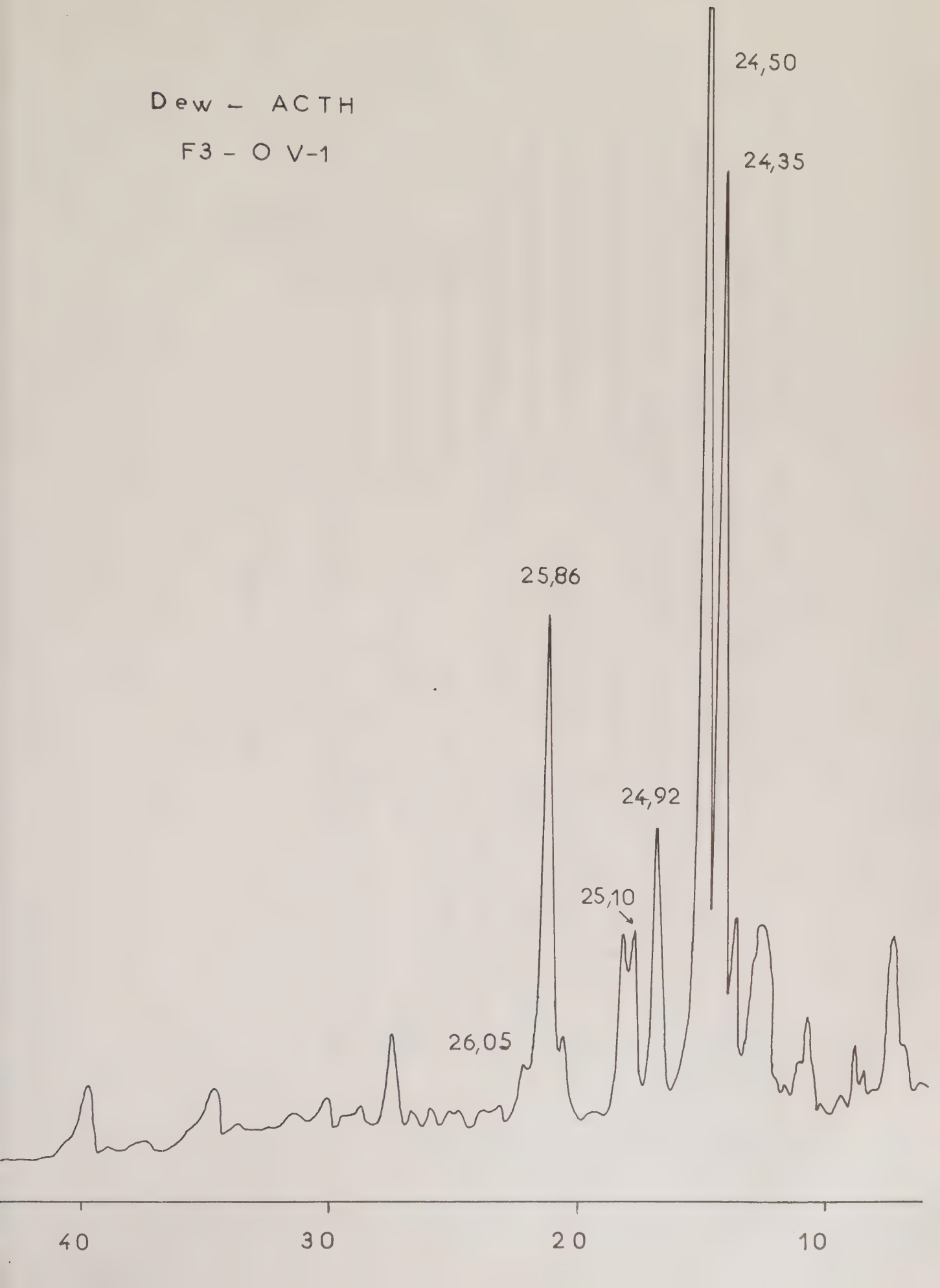
N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
44	28,43	566	117-269-359-449	3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one
*49	29,83	494	117-287-404-479-494 (non silylée en 17)	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one

DECTANCYL : FRACTION N° 7


D e w – DECT.
F 7 – O V-1
29,83
28,43
50
40
30
20

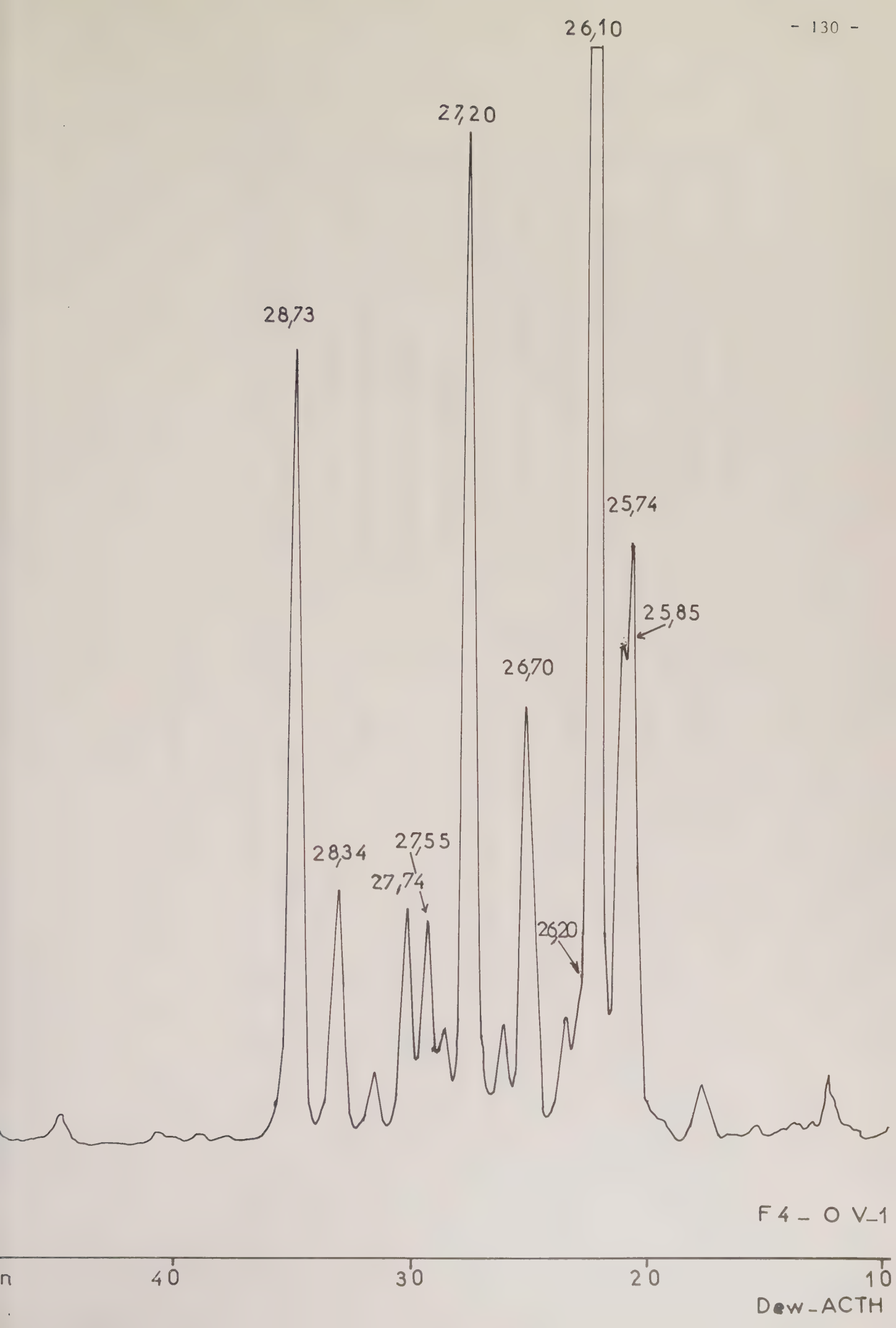
N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
4	24,35	362	108-129-130-155-215-233-244-257-271-272	3α-hydroxy-5α-androstan-17-one
5	24,50	362	108-129-215-244-257-272-347-362	3α-hydroxy-5β-androstan-17-one
7	24,92	434	143-239-329-419-434	4-androstène-3ξ,17ξ-diol
9	25,10	390	215-230-300-375-390	3α-hydroxy-5β,17α-prégnan-20-one
'8	25,86	448	304-343-358-433-448 (énol-TMS)	3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione
'18	26,05	478	215-255-345-435-478	3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one

ACTH : FRACTION N° 3


Dew – ACTH
F3 – O V-1
24,50
24,35
25,86
24,92
25,10
26,05
40
30
20
10

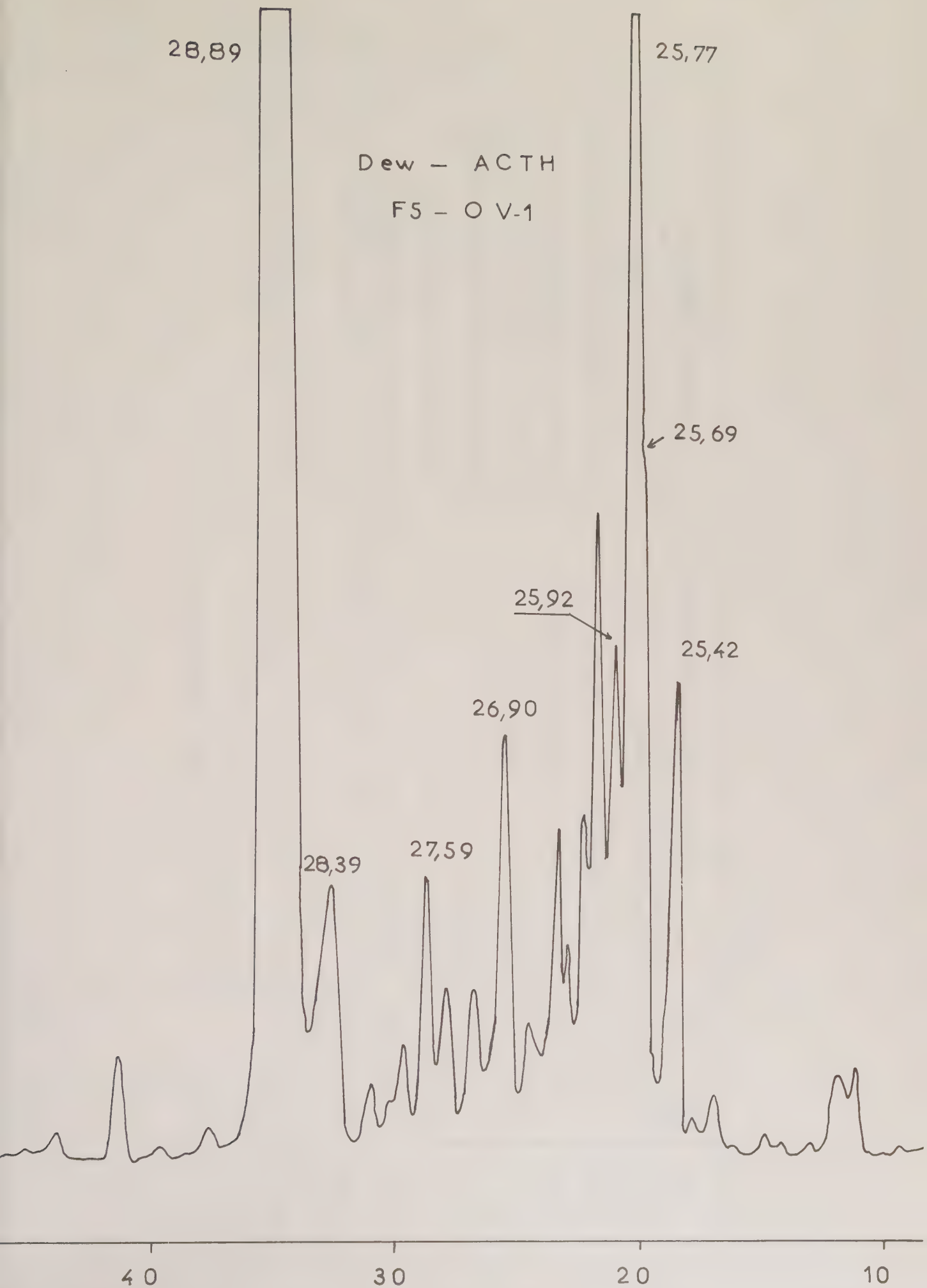
N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
·8	25,74	448	304-343-358-433-448 (énol-TMS)	3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione
·12	25,85	448	304-343-358-433-448 (énol-TMS)	3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione
·18	26,10	478	215-255-345-435-478	3α,17α-dihydroxy-5β-pregnan-20-one
·19	26,20	450	156-184-199-270-360-394-435-450	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
21	26,70	478	143-478	3ξ,11β-dihydroxy-5ξ-prégnan-20-one
26	27,20	464	117-359-449	5β-prégnane-3α,20α-diol
35	27,74	462	117-129-372-447-462	5-prégnene-3β,20α-diol
40	28,34	550	117-129-141-156-157-445-460	5-prégnene-3α,16α,20α-triol
43	28,73	480	255-273-435-480	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol

ACTH : FRACTION N° 4


26,10
27,20
28,73
25,74
25,85
26,70
28,34
27,55
27,74
26,20
F 4 _ O V_1
n
40
30
20
10
Dew_ACTH

N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
11	25,42	450	242-270-345-360-435-450	3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one
18	25,69	478	215-255-345-435-478	3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one
19	25,77	450	156-184-199-270-360-394-450	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
22	25,92	450	156-184-270-360-394-450	3α,11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one
27	26,90	478	215-255-345-435-478	3ξ,17α-dihydroxy-5ξ-prégnan-20-one
32	27,59	462	117-129-372-447-462	5-prégnène-3β,20β-diol
33		464	117-449-464	5α-prégnane-3β,20α-diol
39	28,39	552	117-129-141-156-157-462	5α-prégnane-3α,16α,20α-triol
40		550	117-129-141-156-157-460	5-prégnène-3α,16α,20α-triol
43	28,89	480	255-273-390-435-480	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol

ACTH : FRACTION N° 5

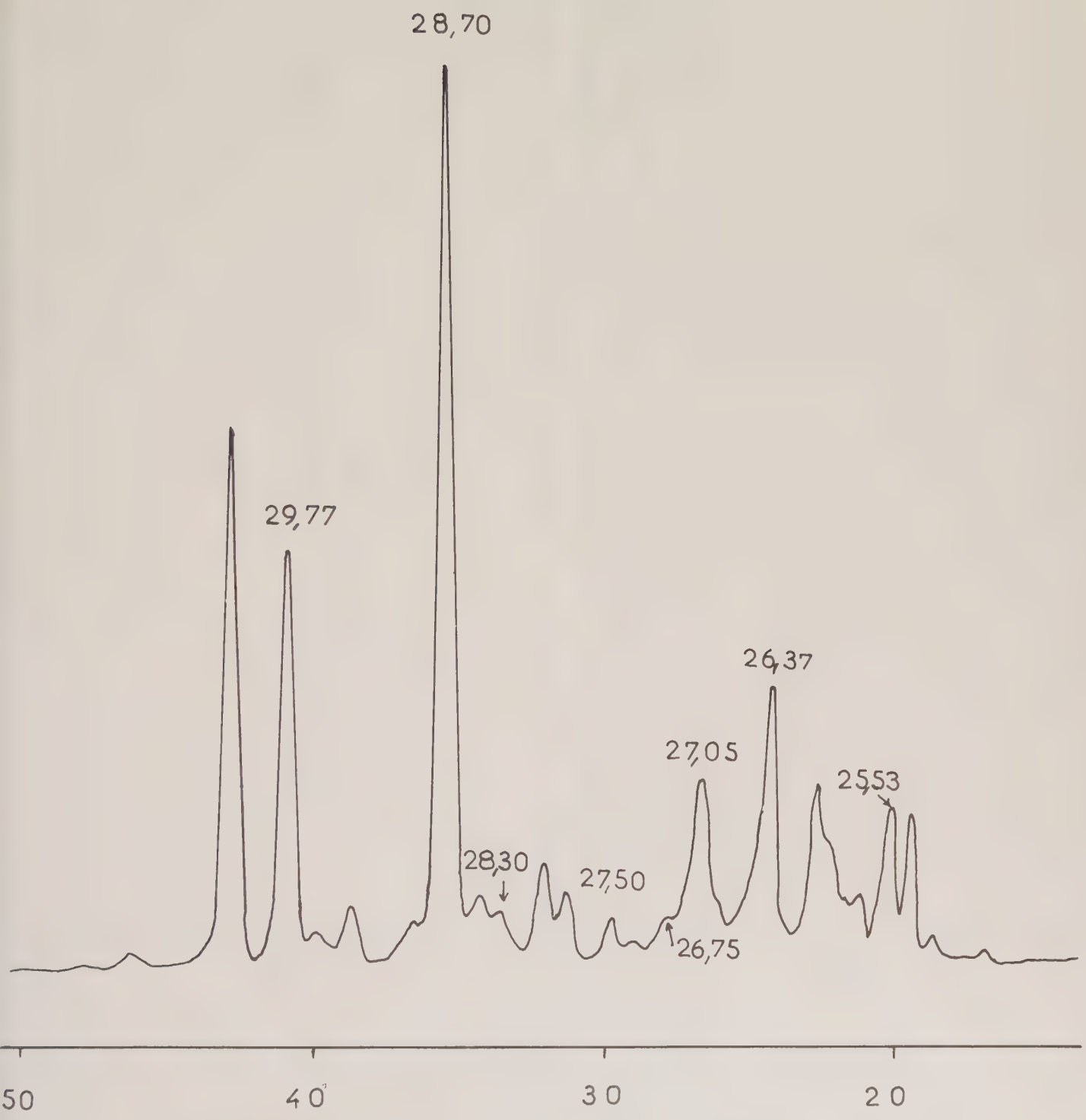

28,89
25,77
Dew — ACTH
F5 — O V-1
25,69
25,92
25,42
26,90
28,39
27,59
40
30
20
10

N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
11	25,53	450	242-270-345-360-435-450	3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one
22	26,37	450	108-156-157-184-270-360-394-450	3α,11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one
*12	26,75	376	117-129-131-142-143-195-271-304-347-376	3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione
	27,05	448	343-358-433-448 (énol-TMS)	3α-hydroxy-5ξ-androstan-11,17-dione
31	27,50	478	215-255-345-435	3β,17α-dihydroxy-5α-prégnan-20-one
39	28,30	552	117-141-156-157-462	5α-prégnane-3α,16α,20α-triol
43	28,70	480	255-273-345-435-480	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol
*49	29,77	494	117-287-404-479-494 (non silylée en 17)	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one
50	29,80	478	117-215-253-271-343-433-478	5-prégnène-3β,17α,20α-triol

ACTH : FRACTION N° 6

Dew - ACTH

F6 - O V-1

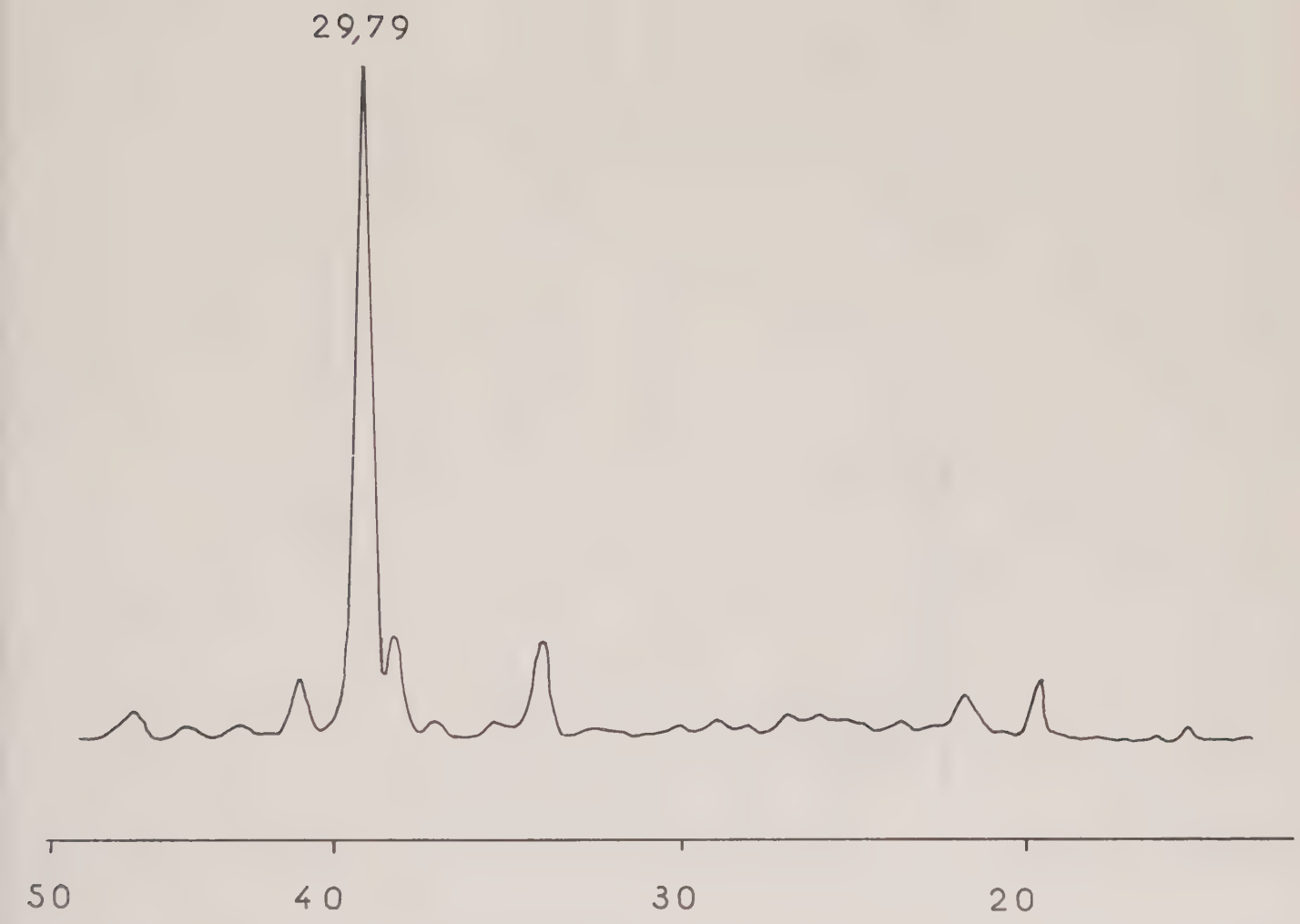


N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDE IDENTIFIE
49	29,79	494	117-287-404-479-494 (non silylée en 17)	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one

ACTH : FRACTION N ° 7

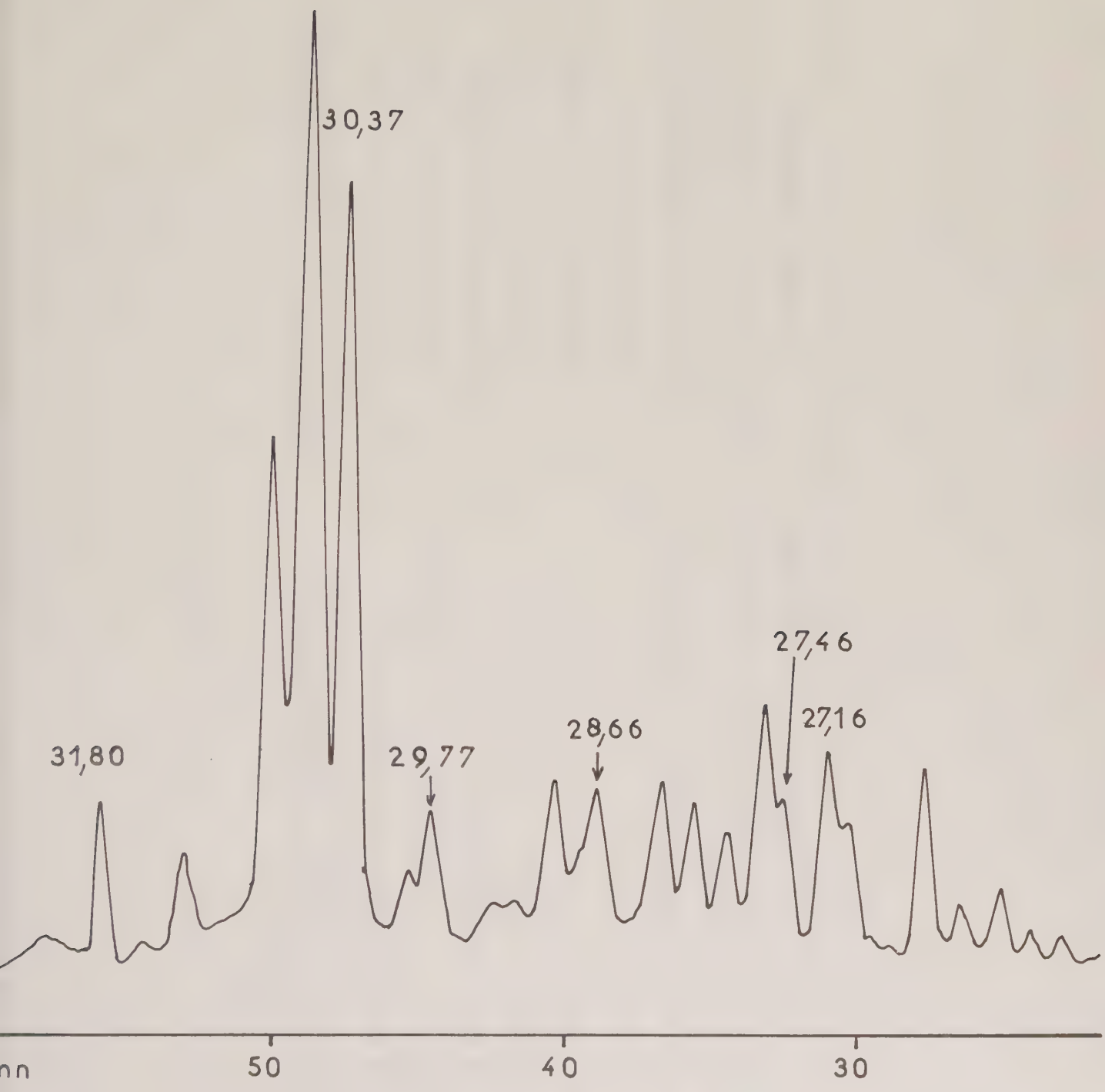
Dew ACTH

F7 OV 1



N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
28	27,16	524	129-143-169-228-254-344-434-524	5ξ-androstane-3ξ,11β,17ξ-triol
30	27,46	524	191-344-434-524	5ξ-androstane-3ξ,16ξ,17ξ-triol
46	28,66	476	96-109-117-129-172-186-371-386-461	3β,16α-dihydroxy-5-prégnèn-20-one
*49	29,77	494	117-287-404-479-494 (non silylée en 17)	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one
*49	30,37	566	117-269-359-449	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one
56	32,00	656	116-201-205-253-270-343-360-433-450-476-523-566	5β-prégnane-3α,11β,17α,20β,21-pentol (β-cortol)

ACTH : FRACTIONS N)° 8 A 11

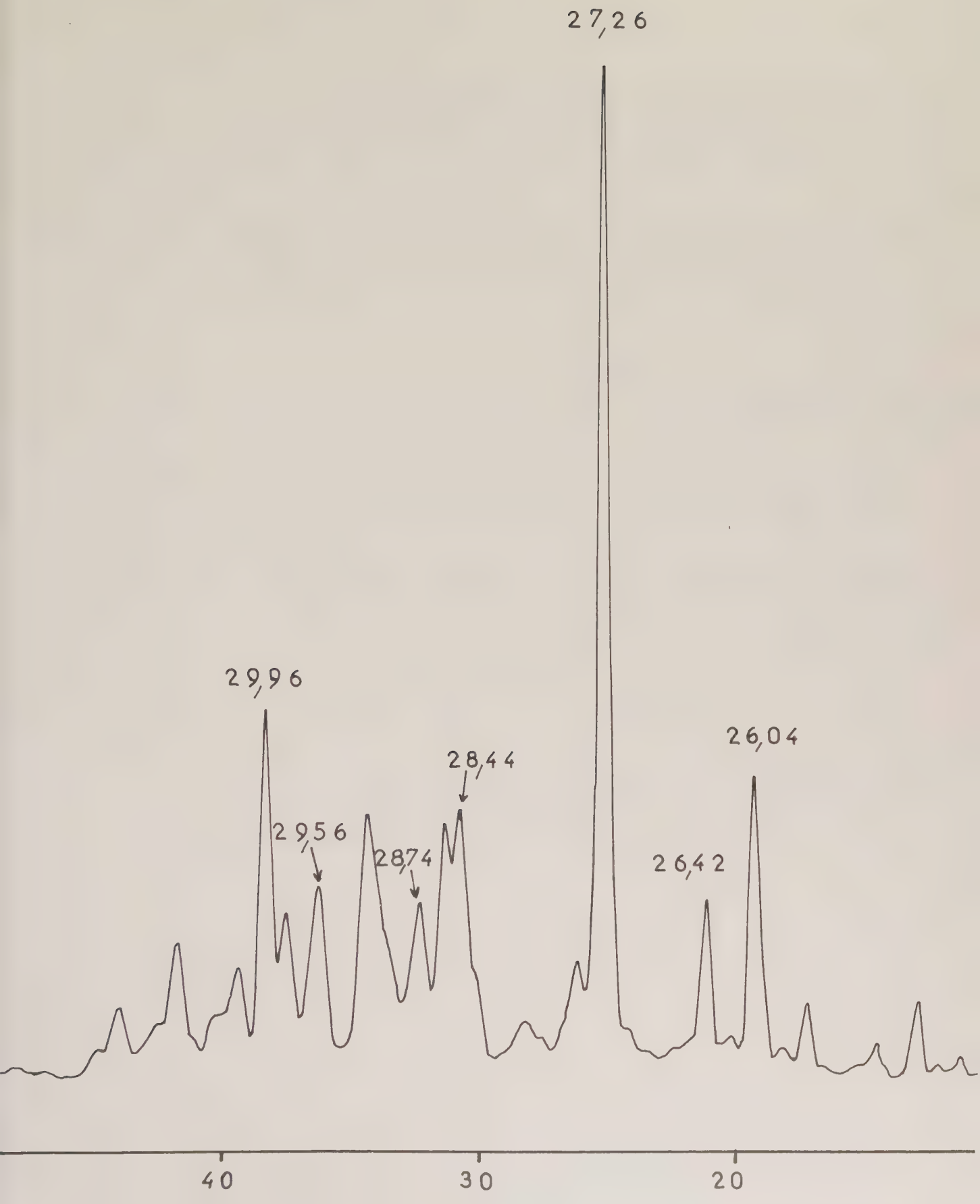


OV_1 F8_11

Dew_ACTH

N°	UM (OV-1)	M^+	MASSES DES PICS PREDOMINANTS	STEROIDES IDENTIFIES
*18	26,04	478	215-255-345-435-478	3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one
22	26,42	450	108-156-157-184-270-360-394-450	3α,11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one
26	27,26	464	117-449-464	5β-prégnane-3α,20α-diol
42	28,44	504	129-324-414-504	estratriène-1,3,5(10)-3β,16α,17β-triol (estriol)
43	28,74	480	255-273	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol
45		552	269-359-449-552	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol
47	29,56	550	117-129-141-156-157-445-460-535-550	5-prégnène-3ξ,16ξ,20ξ-triol
48		552	117-141-156-157-462-537-552	5α-prégnane-3β,16α,20α-triol
*49	29,96	494	117-287 (non silylée en 17)	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one

ACTH : FRACTIONS N° 12 A 14



OV-1 F 12-14

Dew- ACTH

Les spectres de masse (SM) des composés n°2 à 57 (le composé n°1 étant le cholestérol) sont décrits p.138' à 179' (pages respectivement situées en regard des p.138 à 179).

Le tableau p.137 permet de retrouver la description et/ou la reproduction du SM d'un composé déterminé. Dans ce tableau, nous avons souligné le numéro des composés dont le SM est reproduit.

Les pages 173 à 179 présentent en outre les spectres de masse obtenus au niveau d'un pic chromatographique où s'éluaient simultanément plusieurs produits :

page 173 : composés n° 10 et 11 (témoin f.4, UM = 25,37)

page 174 : composés n° '12, 13, 17 et '19 (témoin f.4, UM = 25,75)

page 175 : composés n° 17 et '19 (témoin f.5, UM =25,73)

page 176 : composés n° 40 et 41 (témoin f.4, UM = 28,32)

page 177 : composés n° 43 et 45 (témoin f.6, UM =28,61)

page 178 : composés n° 54 et 55 (témoin f.6, UM = 30,31)

page 179 : composés n° 56 et 57 (témoin f.7, UM = 32,00).

Dans le tableau p.137, le spectre de masse des produits ci-dessus non représentés par ailleurs sous la forme du SM du produit pur est doublement souligné.

DISCUSSION ET INTERPRETATION DES SPECTRES DE MASSE DES DIFFERENTS COMPOSES IDENTIFIES

N°	pages
2	138', 138
3	139', 139
4	138'
5	138'
6	140'
7	141', 141
8	142' et 142 144' et 144
9	145', 145
10	146' 173' et 173
11	147' et 147 173' et 173
12	142', 143, 144' 174' et 174
13	174' et 174
14	148'
15	149', 149
16	150', 150
17	147' 174' et 174 175' et 175
18	151', 151, 152
19	153' et 153 174' et 174 175' et 175
20	155'
21	156'
22	153', 154
23	155', 155
24	157', 157
25	165'
26	157'
27	151'
28	158', 158
29	159', 159
30	160', 160
31	151'
32	146'
33	157'
34	174'
35	146', 146
36	170', 170
37	171', 171
38	172', 172
39	161'
40	162' et 162 176' et 176
41	163' 176' et 176
42	164', 164
43	163' et 163 177' et 177
44	165'
45	167' 177' et 177
46	168', 168
47	162'
48	161'
49	165' et 165 166' et 166
50	169', 169
51	169'
52	167', 167
53	169'
54	169' 178' et 178
55	167' 178' et 178
56	179' et 179
57	165' 179' et 179

N° 2 : 3β-hydroxy-5β-androstan-17-one (UM = 24,20)

séquence du SM : 108-129-155-215-257-272-347-362

N° 4 : 3α-hydroxy-5α-androstan-17-one (UM = 24,30 à 24,36)

séquence du SM : 108-129-130-155-215-233-244-271-272-305-306-347-362

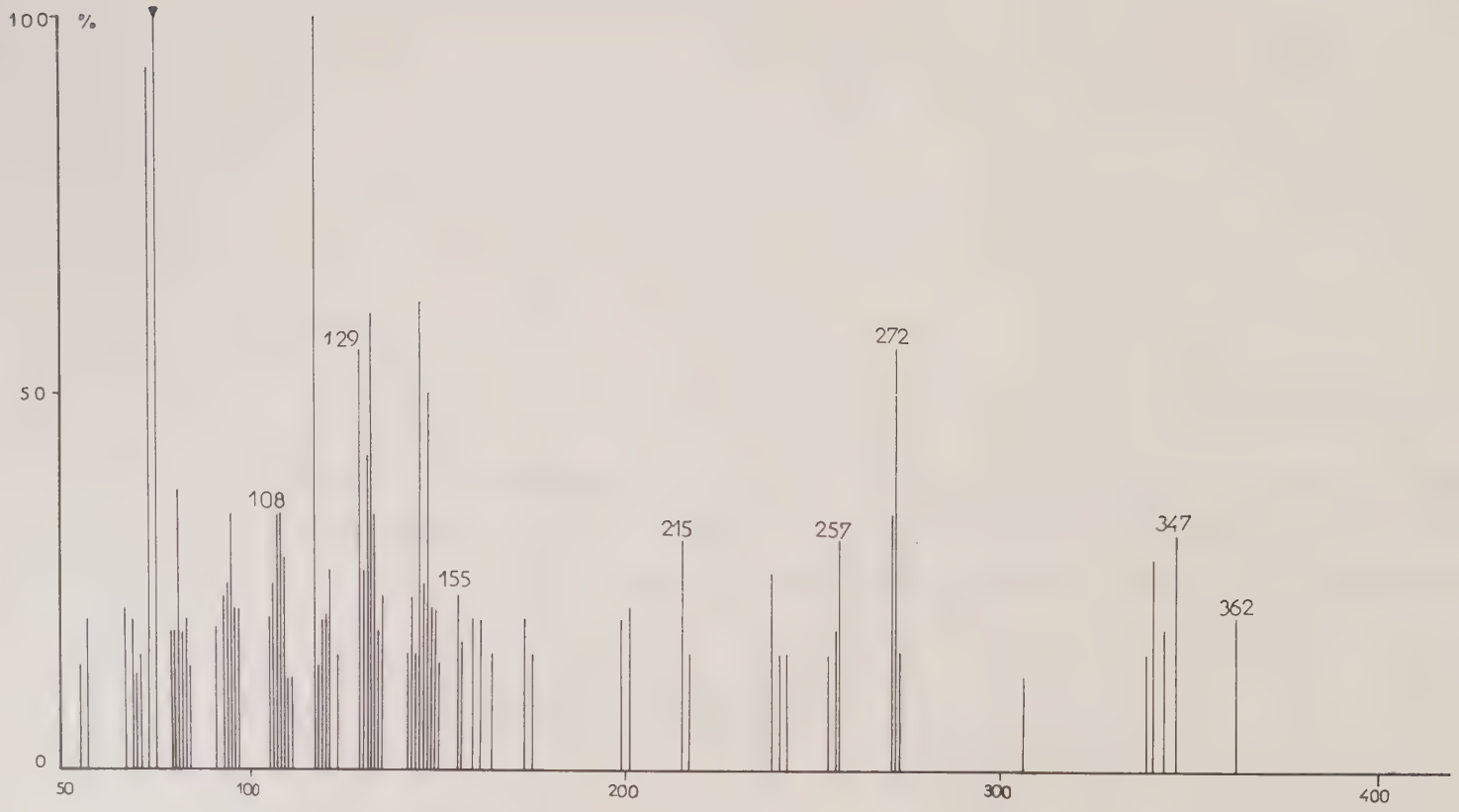
N° 5 : 3α-hydroxy-5β-androstan-17-one (UM = 24,46 à 24,51)

séquence du SM : 108-129-176-215-244-257-272-306-347-362

Ces trois composés présentent un spectre de masse caractéristique des 3-monotriméthylsilyl-5-androstan-17-one (182) : pic moléculaire à m/e : 362, pic de base à m/e = 272 : (M-90) , la perte de 90 unités de masse correspondant au départ du groupement triméthylsilanol, et la séquence à m/e = 108, 215, 257 (M-90+15), 306 (M-56), caractéristique des stéroïdes présentant un groupe oxo dans le cycle D, et 347 (M-15).

Nous remarquons cependant que l'intensité relative du pic à m/e = 176 et du pic à m/e = 244 est particulièrement importante pour le stéréoisomère en 5β.

L'identification de chacun de ces trois composés a été faite par CGL en fonction de son unité méthylène.



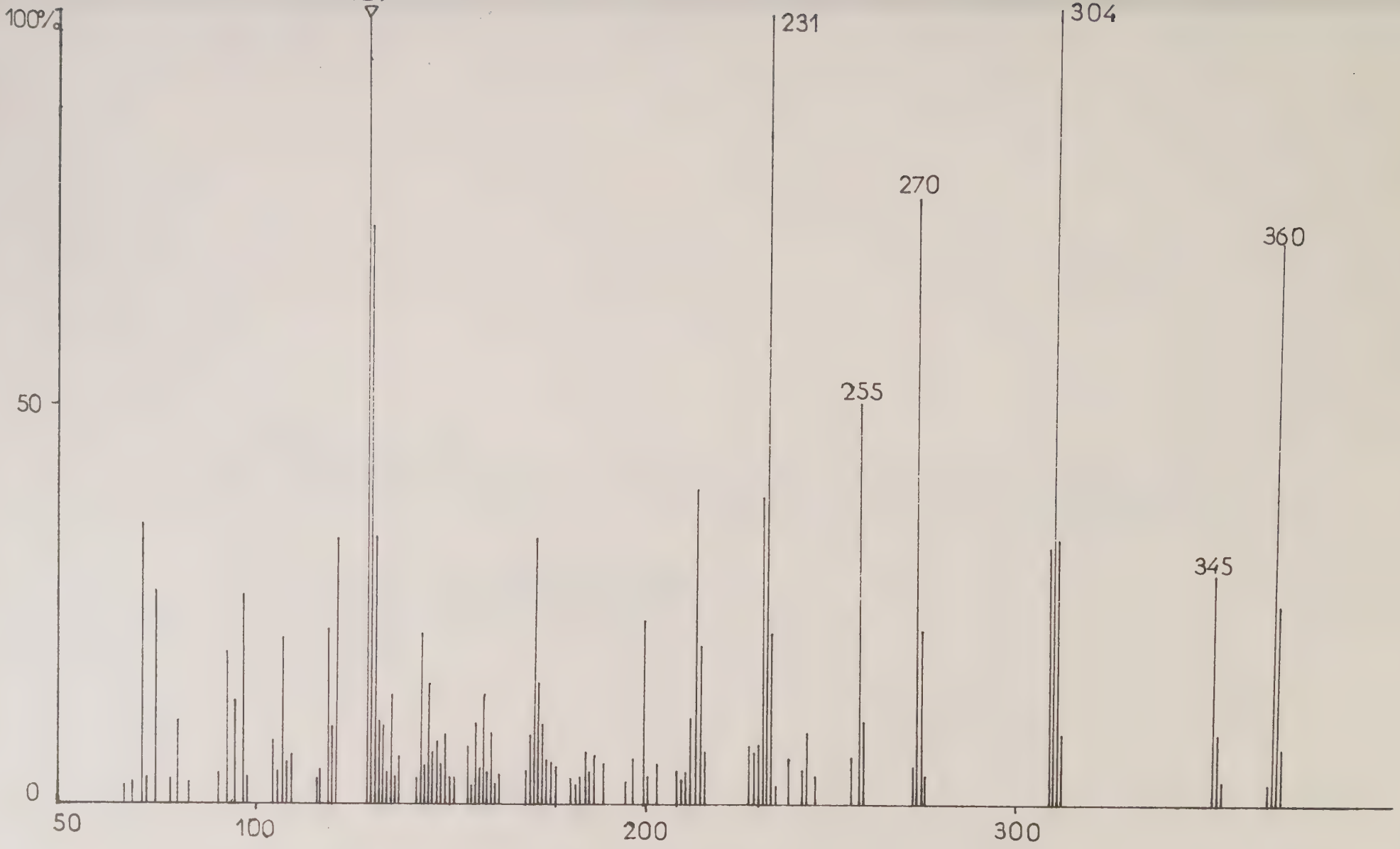
Spectre de masse de la 3β-hydroxy-5β-androstan-17-one (épiétiocholanolone)
sous la forme de son dérivé monotriméthylsilylé.
(composé n°2 : témoin f.3, UM = 24,20)

N° 3 : 3α-hydroxy-5-androsten-17-one (UM =24,25)

séquence su SM : 129-231-255-270-304-360

Ce spectre de masse est identique à celui de la 3β-hydroxy-5-androsten-17-one sous frome de son dérivé triméthylsilylé (182) : pic de base à m/e = 129, caractéristique des 3-hydroxy-5-en-stéroïdes, pic moléculaire M^+ = 360, et séquence caractéristique à m/e =231, 270 et 304 (M-56).

Il est identifié par CGL à la 3α-hydroxy-5-androsten-17-one.



Spectre de masse de la 3α-hydroxy-5-androsten-17-one
sous la forme de son dérivé monotriméthylsilylé.
(composé n° 3 : témoin f.3, UM = 24,25)

N° 6 : 5ξ-androstane-3ξ,11β,17ξ-triol (UM = 24,91)
séquence du SM : 143-169-239-419-434-524

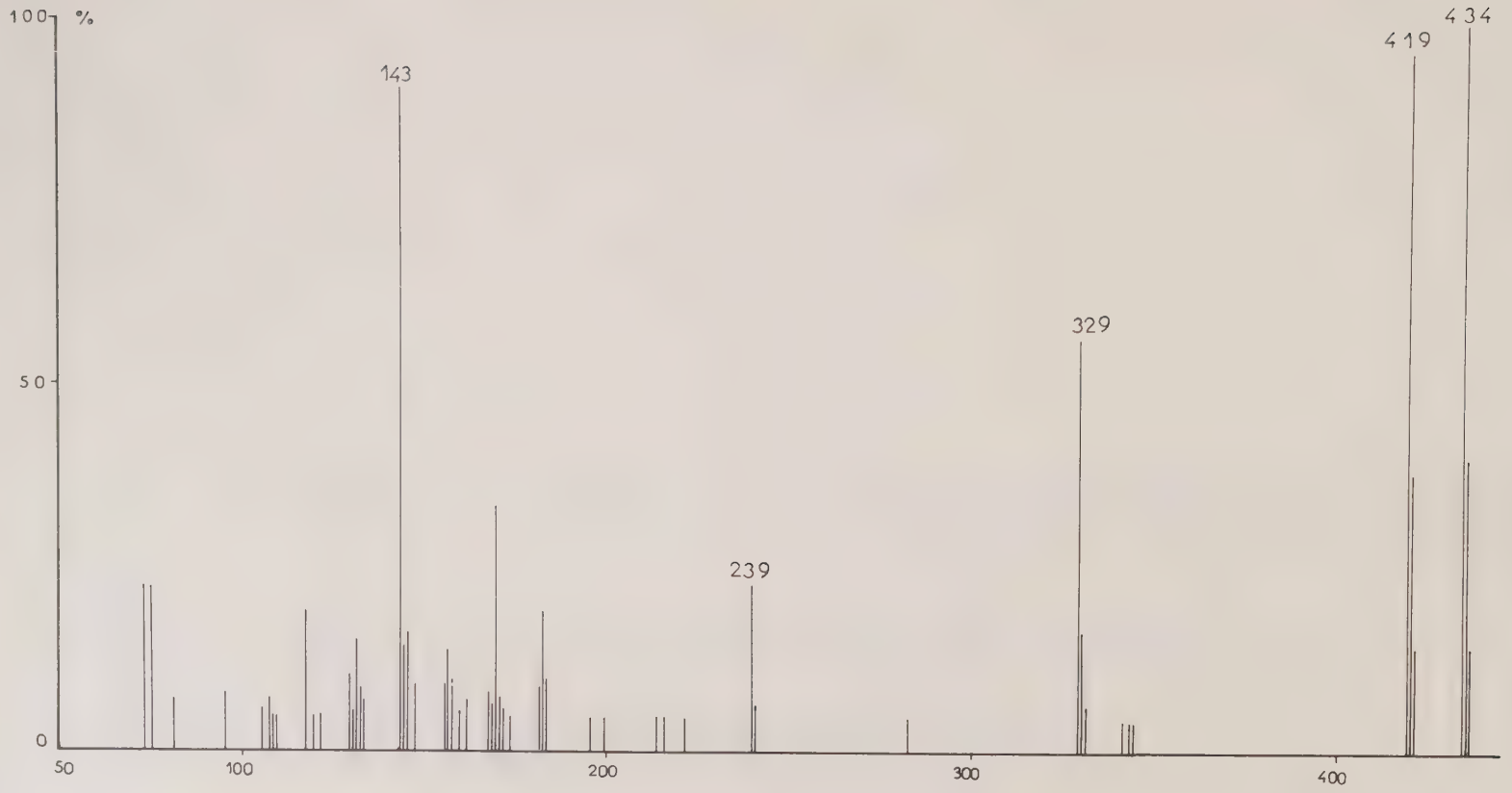
Le pic moléculaire M^+ de ce composé à m/e = 524 indique qu'il s'agit d'un androstane-3,X,17-triol-tris-triméthylsilyl, les pics à m/e = 143 et 169 évoquant pour X la position 11β (13).

SPECTRE NON REPRODUIT

N° 7 : 4-androstène-3ξ,17ξ-diol (UM = 24,92 à 25,01)

séquence du SM : 143-239-329-419-434

Le spectre de masse de ce composé est semblable à celui du 4-androstène-3α,17β-diol (113), notamment pour ce qui concerne les pics à m/e = 143, 329, 419 et 434 (M^+). Cependant, le pic de base à m/e = 434 (pic de base à m/e = 143 pour les 4-androstène-3,17-diols) évoque également la possibilité d'un androstane-3,7,17-triol élué en même temps.

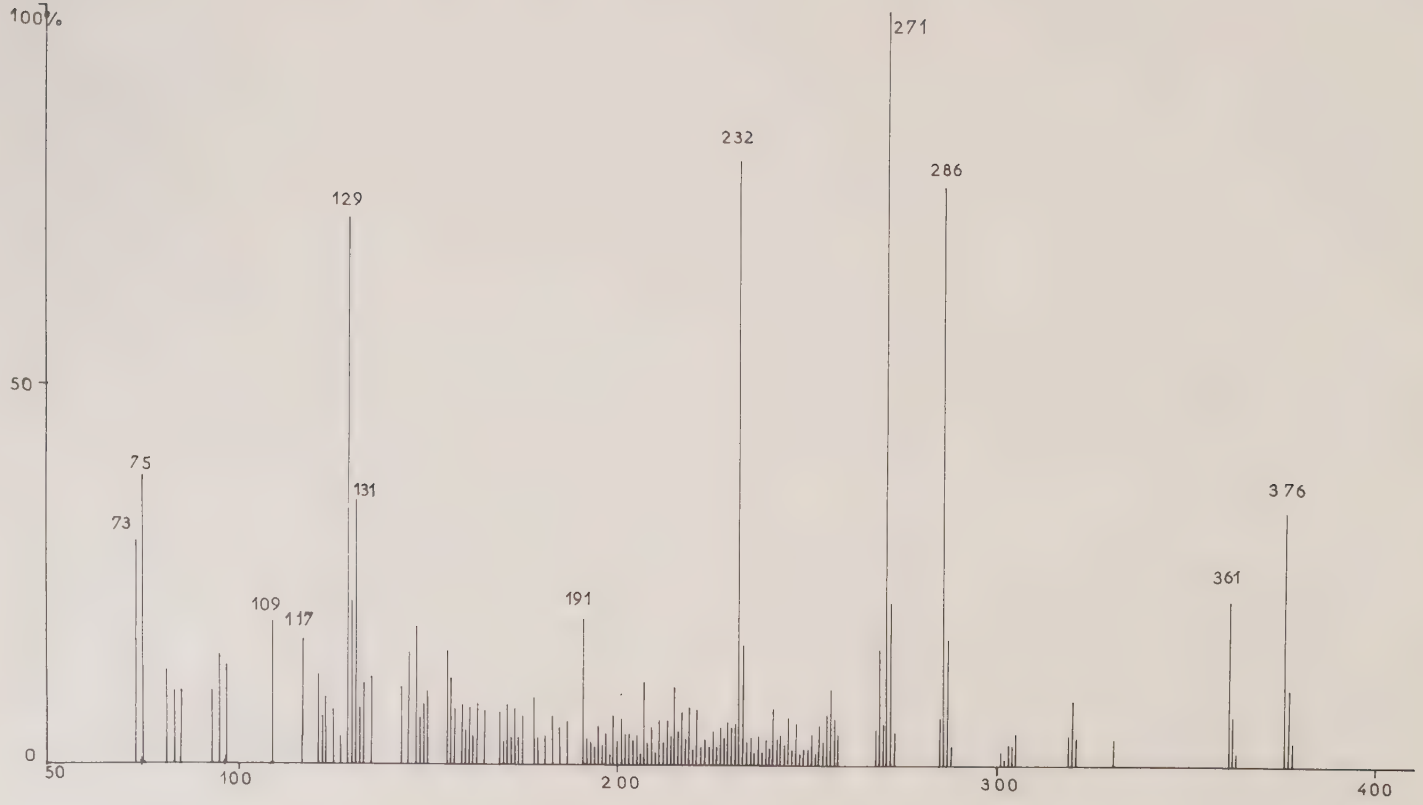


Spectre de masse du 4-androstène-3ξ,17ξ-diol
sous la forme de son dérivé bistriméthylsilylé
(composé n° 7 : témoin f.3, UM = 25,01)

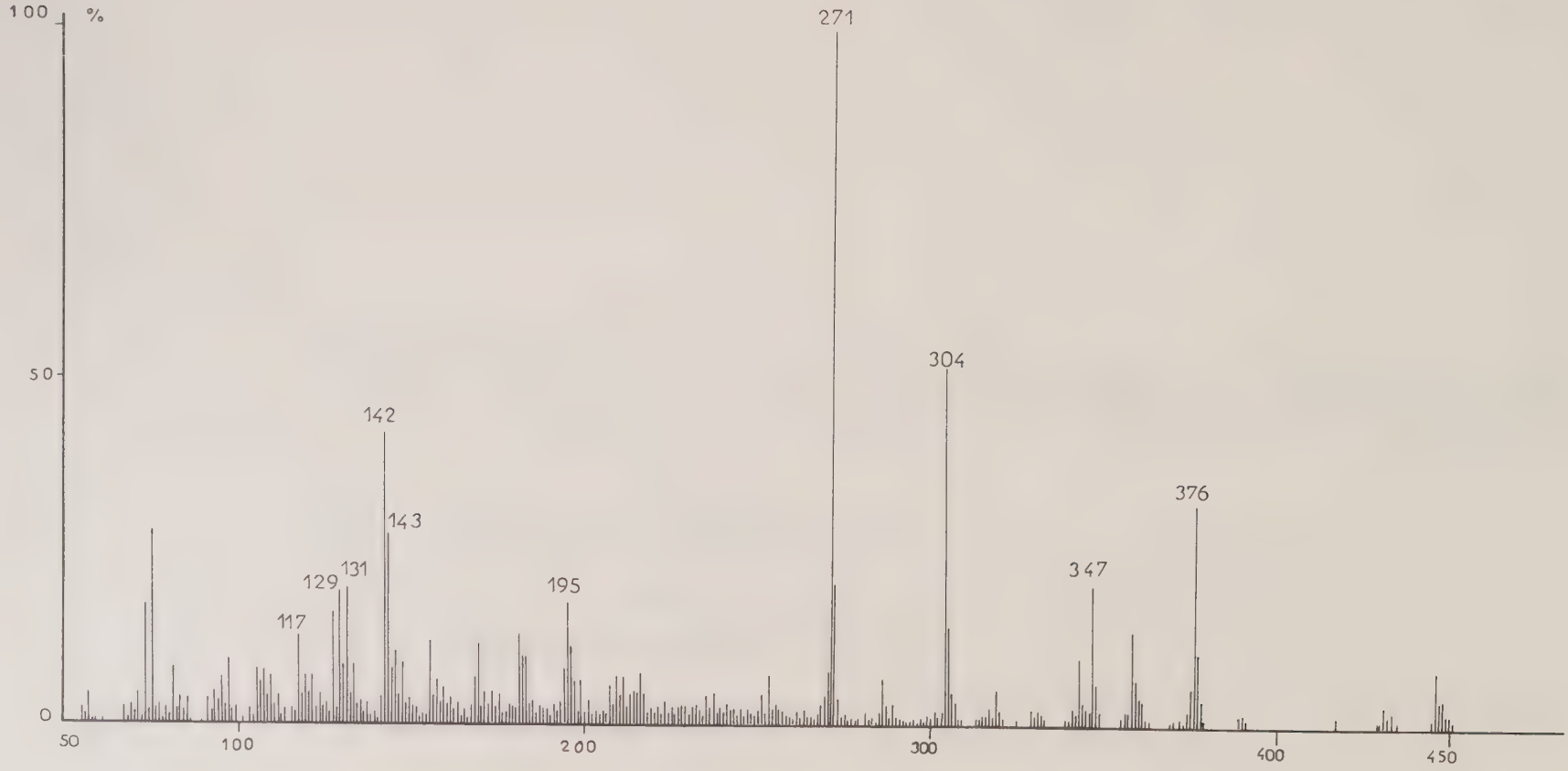
N°'8 : 3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione (UM = 25,05 à 25,10)
séquence du SM : 129-131-232-271-286-361-376

N°'12 : 3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione (UM = 25,55 à 25,70)
séquence du SM : 117-129-131-142-143-195-271-286-304-347-376

Ces spectres de masse sont caractéristiques de la 3α-monotriméthylsilyl-5α-androstan-11,17-dione et de la 3α-monotriméthylsilyl-5β-androstan-11,17-dione (34).



Spectre de masse de la 3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione
sous la forme de son dérivé monotriméthylsilylé.
(composé n° 8 : témoin f.4, UM = 25,05)

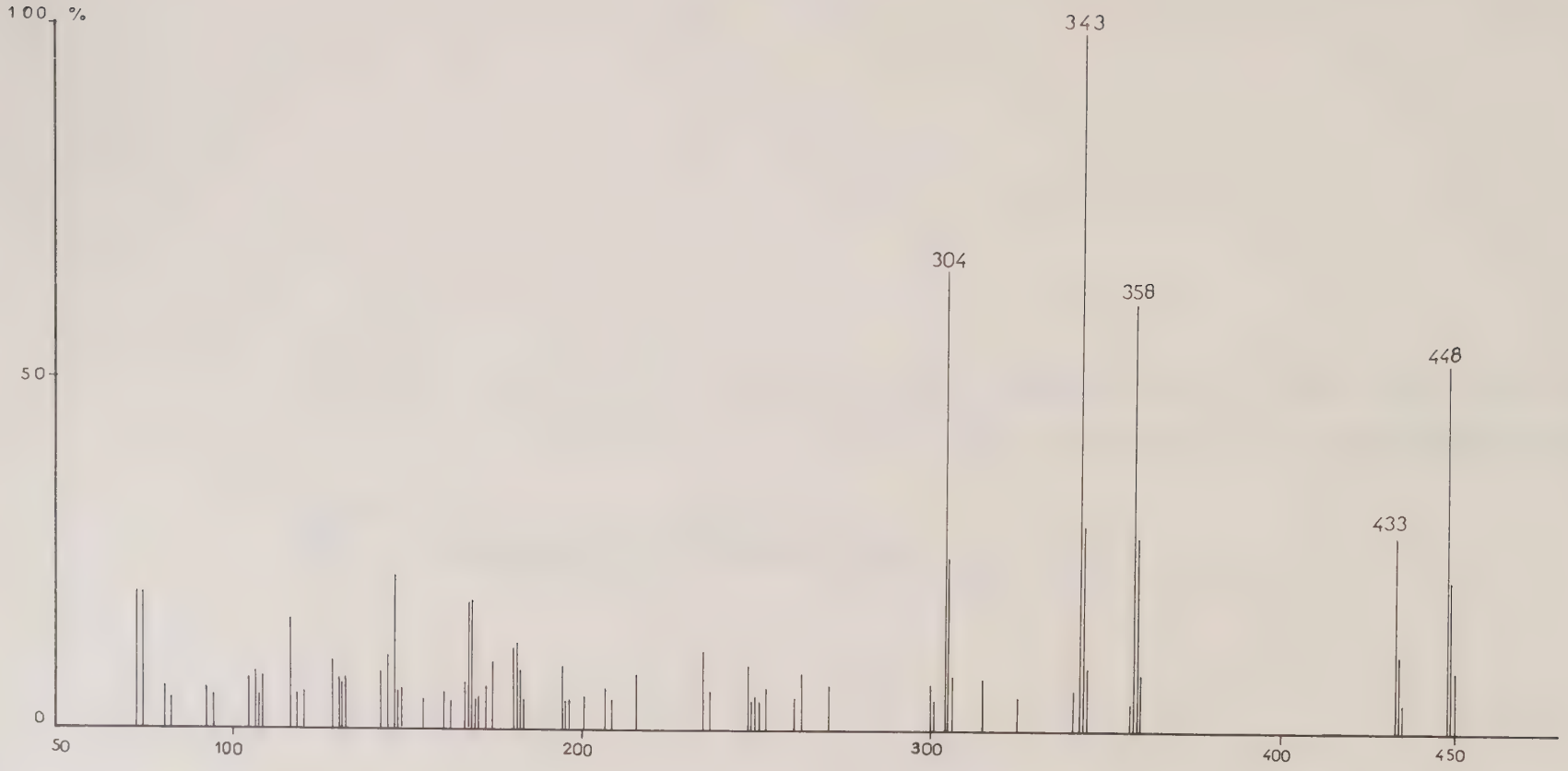


Spectre de masse de la 3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione
sous la forme de son dérivé monotriméthylsilylé.
(composé n° 12 : témoin f.4, UM = 25,70)

N°'8 : 3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione (UM = 25,74 à 25,86)
séquence du SM : 304-343-358-433-448

N°'12 : 3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione (UM = 25,85 à 25,89)
séquence du SM : 304-343-358-433-448

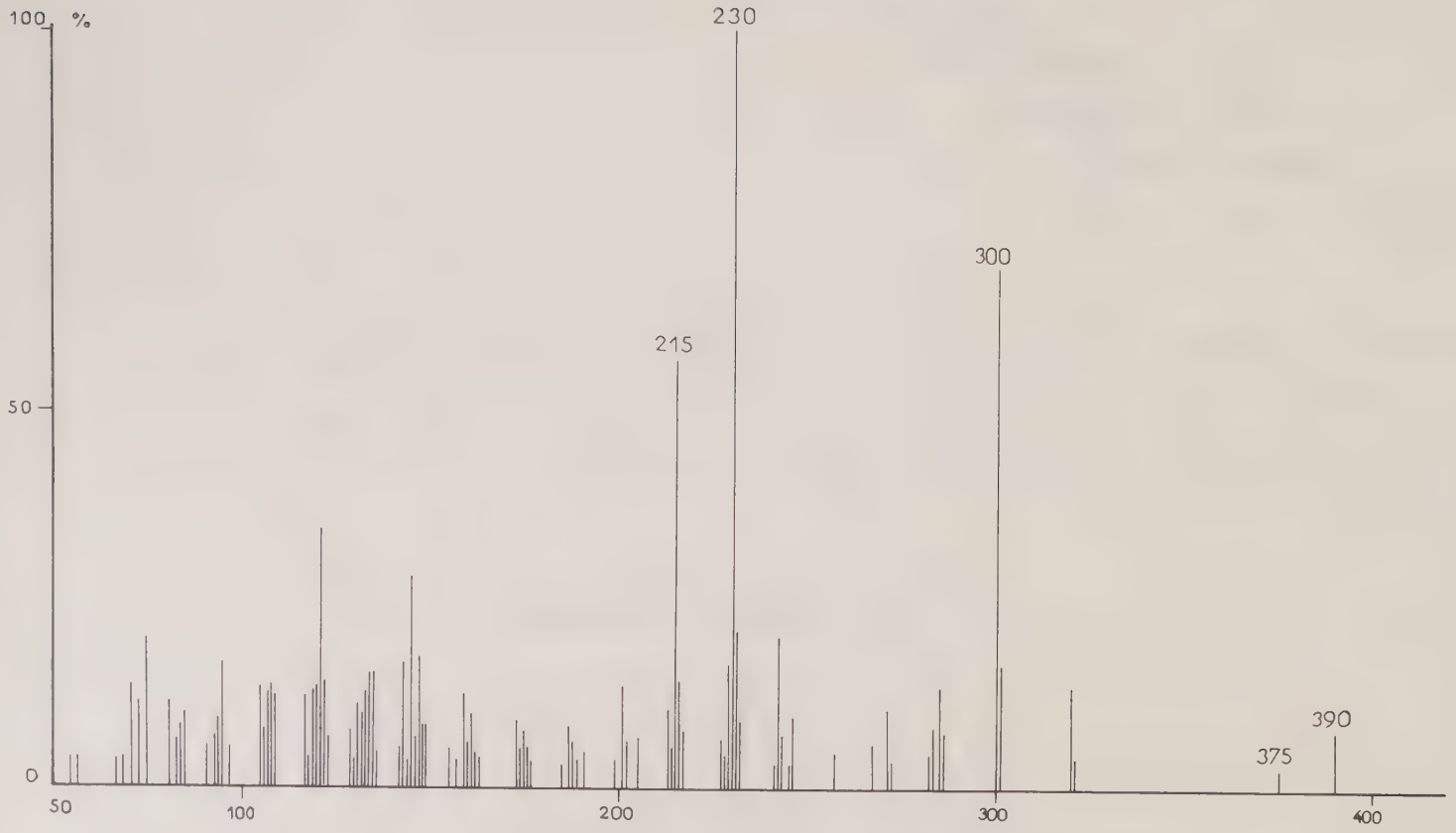
Chacun de ces deux spectres de masse est caractéristique des énol-TMS des 3α-hydroxy-androstan-11,17-dione, l'énolisation s'effectuant probablement au niveau de la fonction oxo portée par le carbone 17 (34).



Spectre de masse de la 3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione
sous la forme de son dérivé énol-triméthylsilylé.
(composé n° 8 : témoin f.3, UM = 25,70)

N° 9 : 3α-hydroxy-5β,17α-prégnan-20-one (UM = 25,10 à 25,20)
séquence du SM : 215-230-300-375-390

La séquence de ce spectre de masse est typique de la 3α-monotriméthylsilyloxy-5β-prégnan-20-one, le pic de base à m/e = 230 impliquant pour la chaîne latérale une position 17α (16).



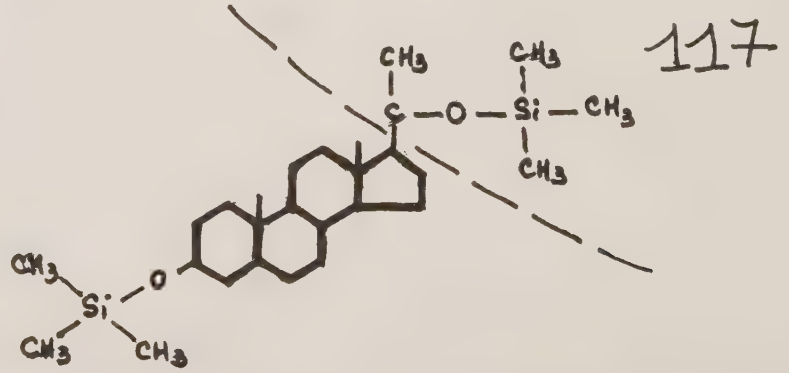
Spectre de masse de la 3α-hydroxy-5β,17α-prégnan-20-one
sous la forme de son dérivé monotriméthylsilylé.
(composé n° 9 : témoin f.3, UM = 25,12)

N° 10 : 5-prégnène-3α,20ξ-diol (UM = 25,34 à 25,37)
séquence du SM : 117-129-282-372-447-462

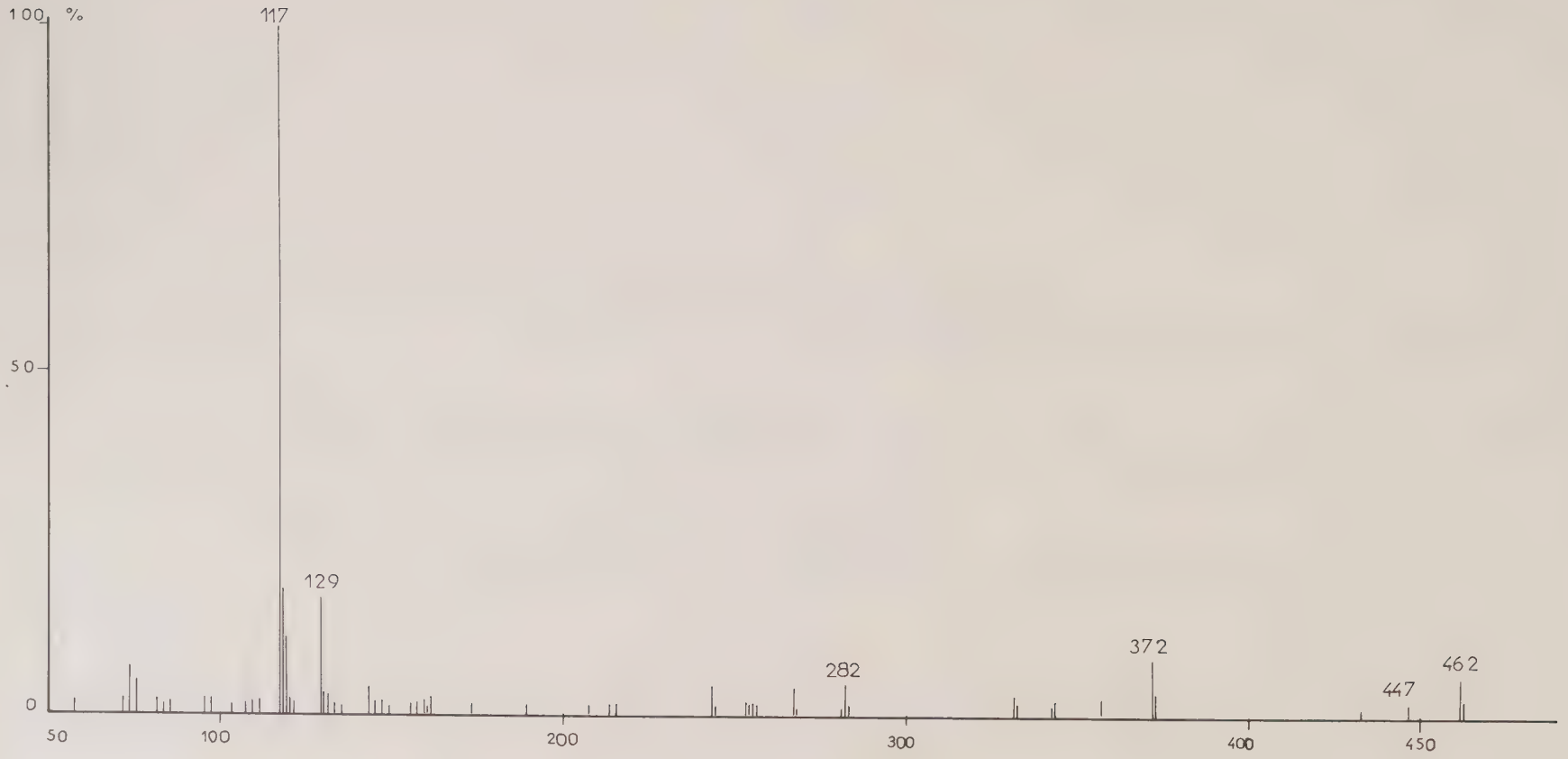
N° 32 : 5-prégnène-3β,20β-diol (UM = 27,59)
séquence du SM : 117-129-282-372-447-462

N° 35 : 5-prégnène-3β,20α-diol (UM = 27,68 à 27,75)
séquence du SM : 117-129-282-372-447-462

Ces spectres de masse sont identiques et typiques des 5-prégnène-3,20-diol sous forme de leur dérivé bistriméthylsilylé (182). Le pic à m/e = 129 est caractéristique des 3 β-hydroxy-5-ène-stéroïdes, et le pic à m/e = 117 (pic de base) est caractéristique des 20-hydroxy-21-désoxystéroïdes, ainsi que le montre le schéma de fragmentation ci-dessous.



L'identification de chaque composé a été effectuée d'après son UM en CGL.

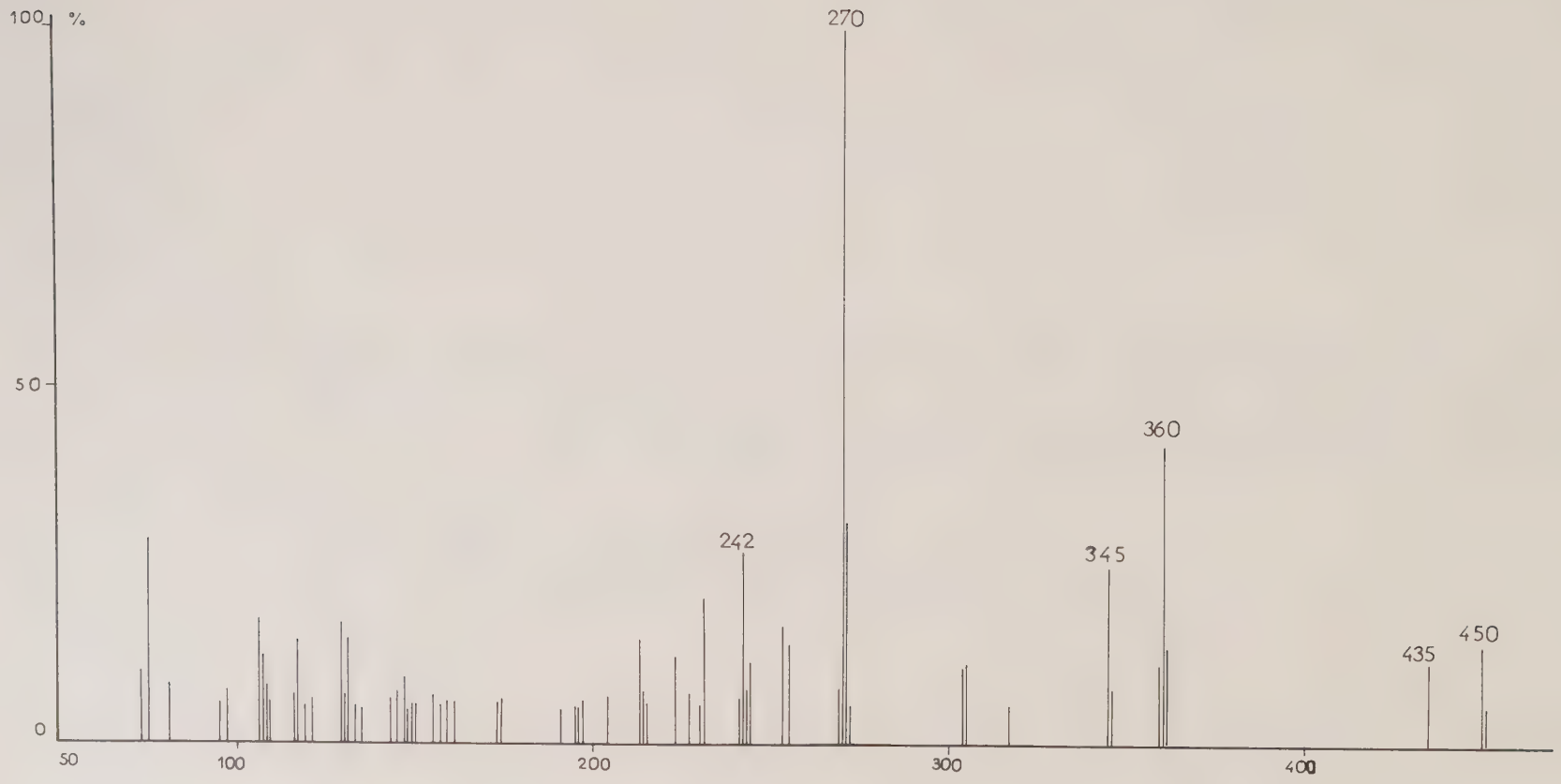


Spectre de masse du 5-prégnène-3β,20α-diol
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 35 : témoin f.4, UM = 27,75)

N° 11 : 3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one (UM = 25,37 à 25,53)
séquence du SM : 242-270-345-360-435-450

N° 17 : 3α,7α-dihydroxy-5β-androstan-17-one (UM = 25,73 à 25,89)
séquence du SM : 270-360-435-450

Ces deux spectres de masse caractérisent les 3,7-dihydroxy-5-androstan-17-one, sous forme de leru dérivé bis-triméthylsilylé (80,82).



Spectre de masse de la 3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 11 : témoin f.5, UM =25,38)

N° 14 : 3ξ,X-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one (UM = 25,80)
séquence du SM : 129-270-345-360-450

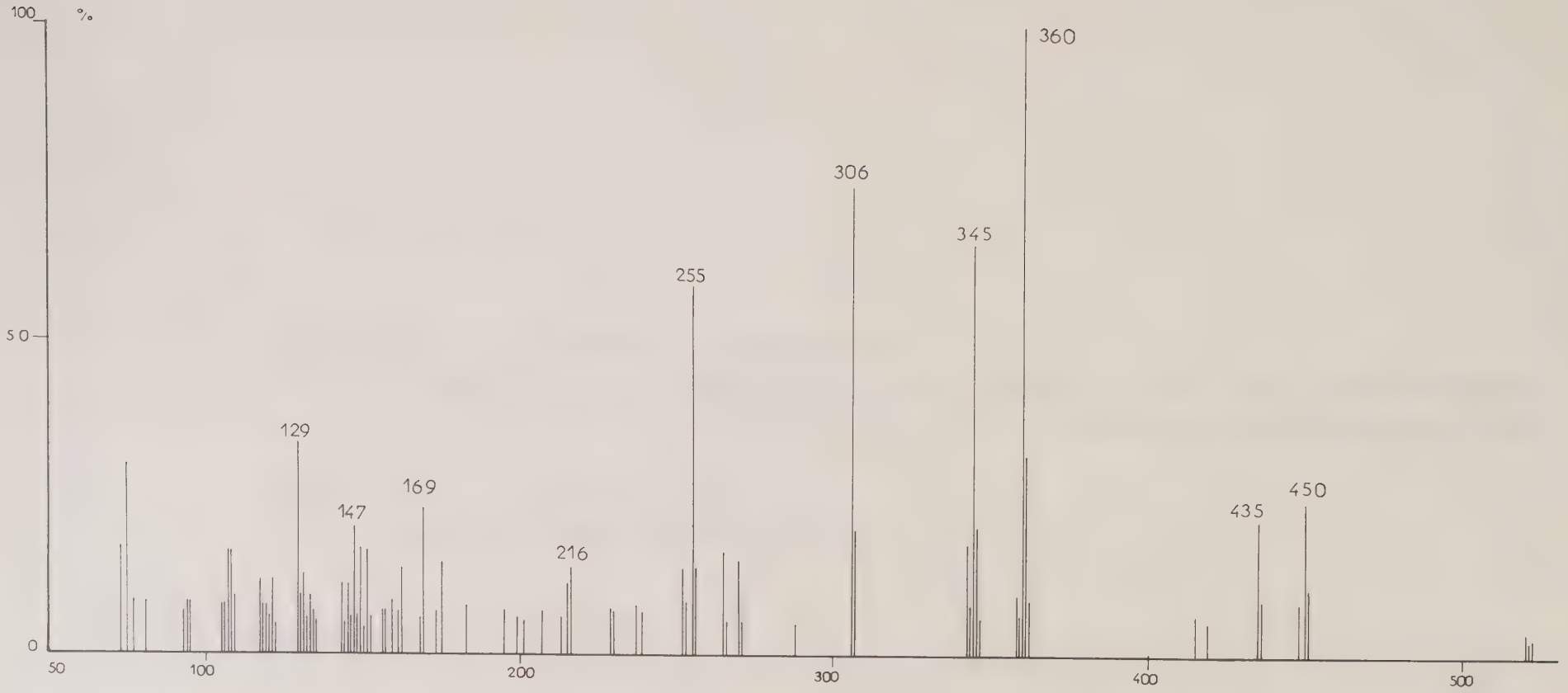
Le pic moléculaire à M^+ = 450 , et la séquence à m/e = 270, 345, 360 indique qu'il s'agit d'une androstanediolone. Ce composé est rapporté à une 3ξ,X-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one, sans qu'il nous ait été possible d'évoquer pour X une position déterminée.

SPECTRE DE MASSE NON REPRODUIT

N° 15 : 3ξ,X-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one (UM =26,03)

séquence du SM : 129-147-169-216-255-306-345-360-435-450

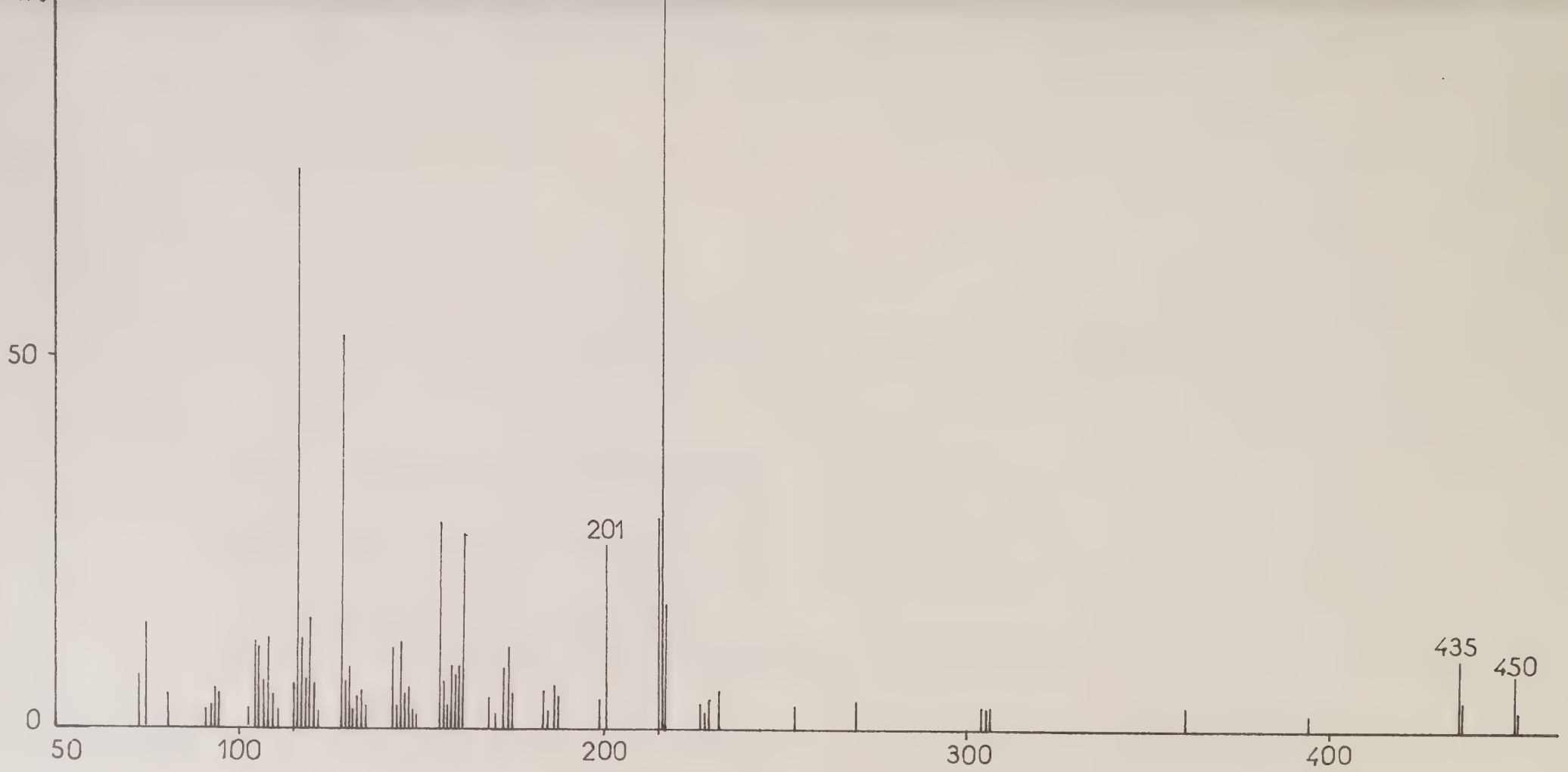
L'interprétation de ce spectre de masse est identique à celle du spectre du composé n° 14 (page 148').



Spectre de masse de la 3ξ,X-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 15 : témoin f.6, UM = 26,03)

N° 16 : 3α,16α-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one (UM = 25,83)
séquence du SM : 201-216-306-450

Ce spectre de masse est caractéristique des 3,16-dihydroxy-androstan-17-one sous forme bis-triméthylsilyl : pic moléculaire M^+ à m/e = 450 et pic de base à m/e =216 (M-(144+90)) caractéristique des 16α-hydroxy-17-oxo-stéroïdes.



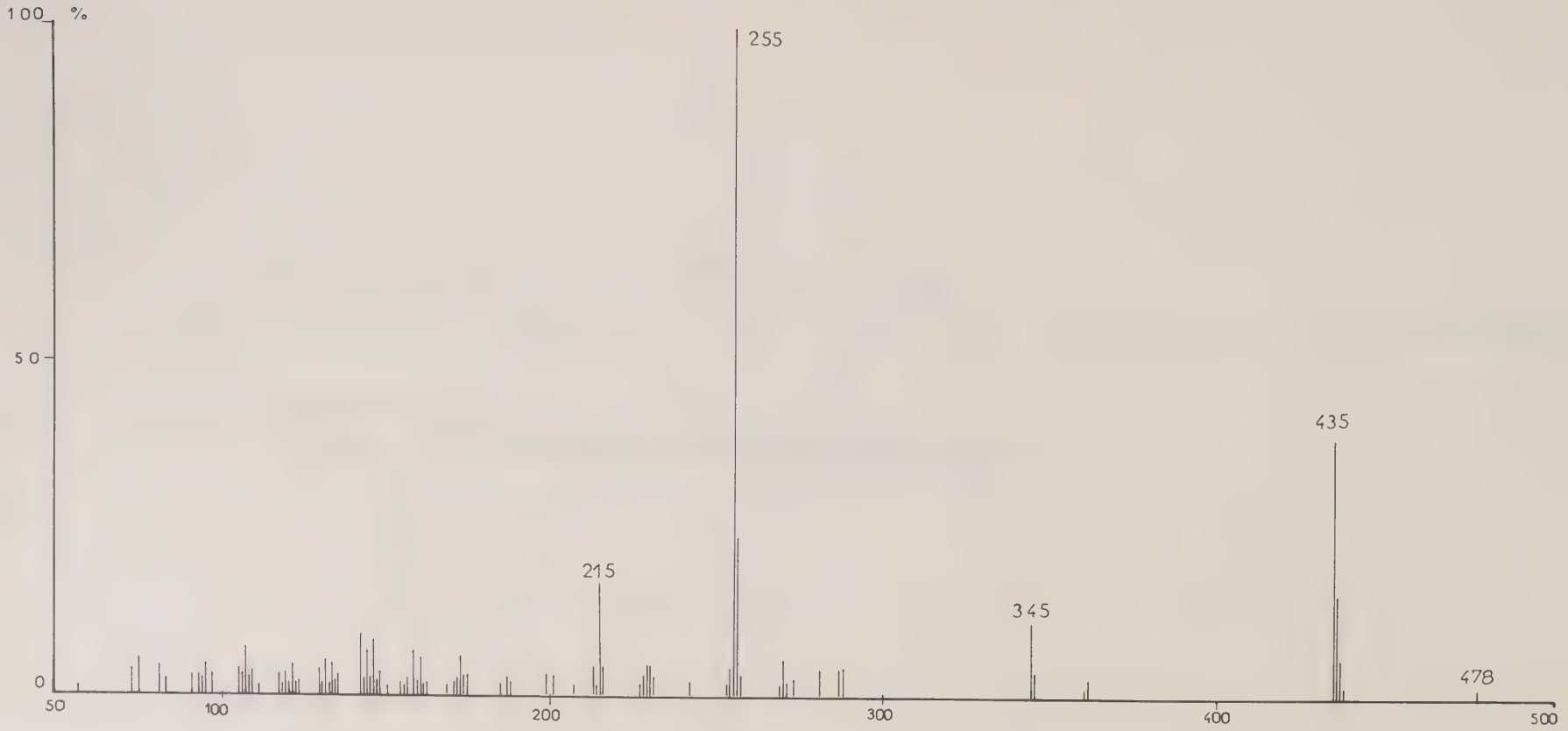
Spectre de masse de la 3α,16α-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 16 : dectancyl f.3, UM = 25,83)

N° 18 : 3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one (UM = 25,93 à 26,10)
séquence du SM : 215-255-345-435-478

N° 27 : 3ξ,17α-dihydroxy-5ξ-prégnan-20-one (UM = 26,90)
séquence du SM : 215-255-345-435-478

N° 31 : 3β,17α-dihydroxy-5α-prégnan-20-one (UM = 27,50 à 27,55)
séquence du SM : 215-255-345-435-478

Les spectres de masse de chacun de ces composés sont caractéristiques 3,17α-bis-triméthylsilyl-5-prégnan-20-one. Nous remarquons ici que l'hydroxyle en 17α est silylé (43).



Spectre de masse de la 3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 18 : témoin f.4, UM = 26,02)

N° '18 : 3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one (UM = 26,88)
séquence du SM : 117-230-231-242-243-550

Ce spectre de masse est caractéristique de la 3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one sous la forme de son dérivé énol-triméthylsilylé.

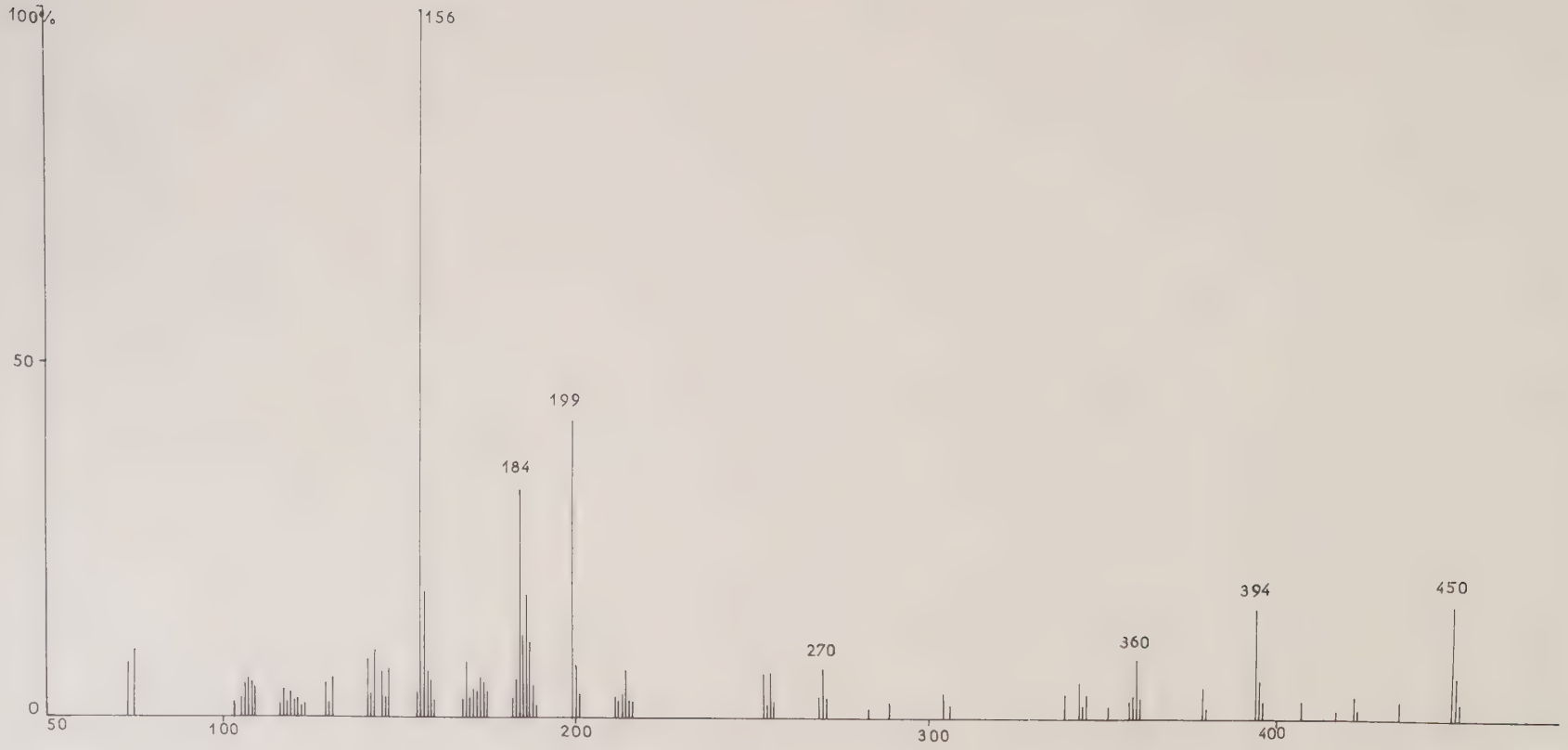
SPECTRE DE MASSE NON REPRODUIT

N° 19 : 3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one (UM = 26,05 à 26,20)
séquence su SM : 156-184-199-270-360-450

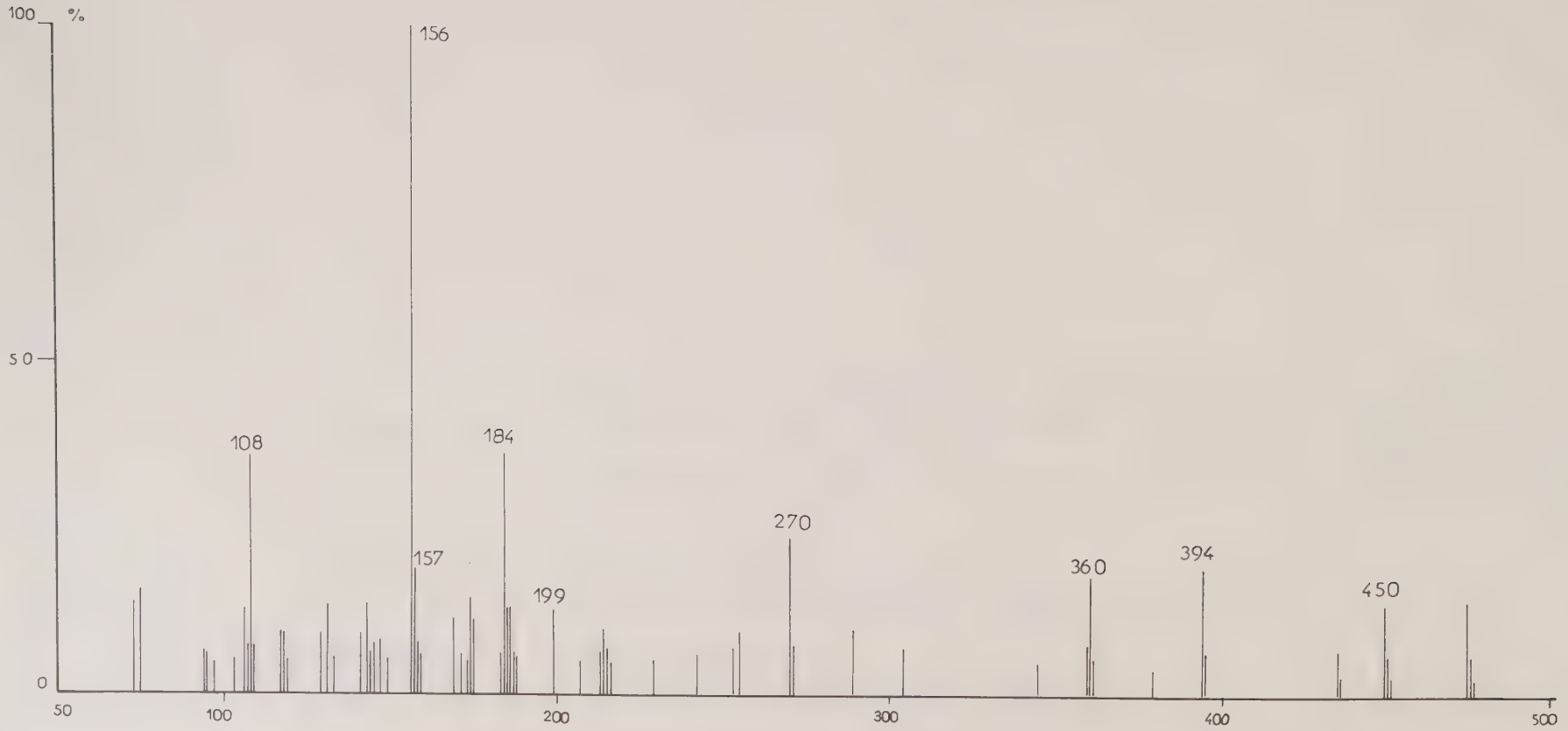
N° 22 : 3α,11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one (UM = 26,37 à 26,47)
séquence du SM : 108-156-157-184-270-360-394-450

Le spectre de masse de chacun de ces deux composés est caractéristique des 3,11β-bis-triméthylsilyl-androstan-17-one (82). Nous remarquons que l'hydroxyle en 11β est silylé.

L'identification de chaque isomère s'est fait par son UM en CGL. Il faut signaler que, pour l'isomère 5α , le pic à m/e = 199 a une intensité supérieure à celle du pic à m/e = 394 ; pour l'isomère 5β, au contraire, le pic à m/e = 394 est d'intensité supérieure à celle du pic à m/e = 199.



Spectre de masse de la 3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 19 : témoin f.4, UM = 26,08)



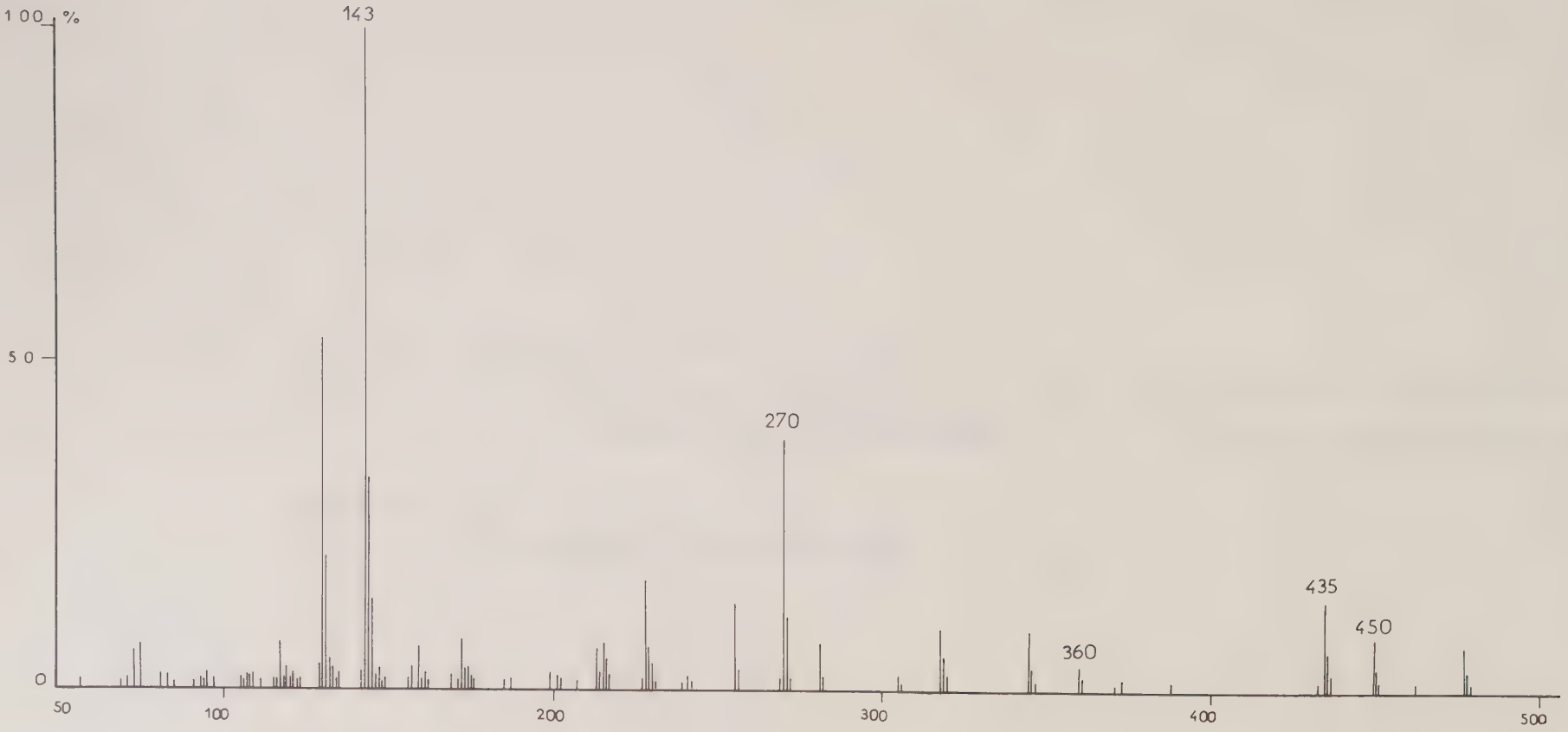
Spectre de masse de la 3α,11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 22 : témoin f.5, UM = 26,39)

N° 20 : 3α,15α-dihydroxy-5α-androstan-17-one (UM = 26,56)
séquence du SM : 143-270-435-450

N° 23 : 3α, 15α-dihydroxy-5β-androstan-17-one (UM = 26,63 à 26,68)
séquence du SM : 143-270-360-435-450

Le pic moléculaire M^+ à m/e = 450 indique qu'il s'agit d'une 3,X-bis-triméthylsilyl-androstan-17-one. Le pic de base à m/e = 143 affirme pour X la position 15α (82).

L'identification de chaque isomère est effectuée d'après son UM en CGL.



Spectre de masse de la 3α,15α-dihydroxy-5β-androstan-17-one
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 23 : témoin f.4, UM = 26,68)

N° 21 : 3ξ,11β-dihydroxy-5ξ-prégnan-20-one (UM =26,70)
séquence du SM : 143-478

Le pic moléculaire à m/e = 478 indique qu'il s'agit d'une dihydroxy-prégnan-20-one, sous forme bis-triméthylsilylée, tandis que le pic à m/e = 143 s'observe, pour cette série de composés, lorsqu'il y a un hydroxyle en 11β (42).

SPECTRE DE MASSE NON REPRODUIT

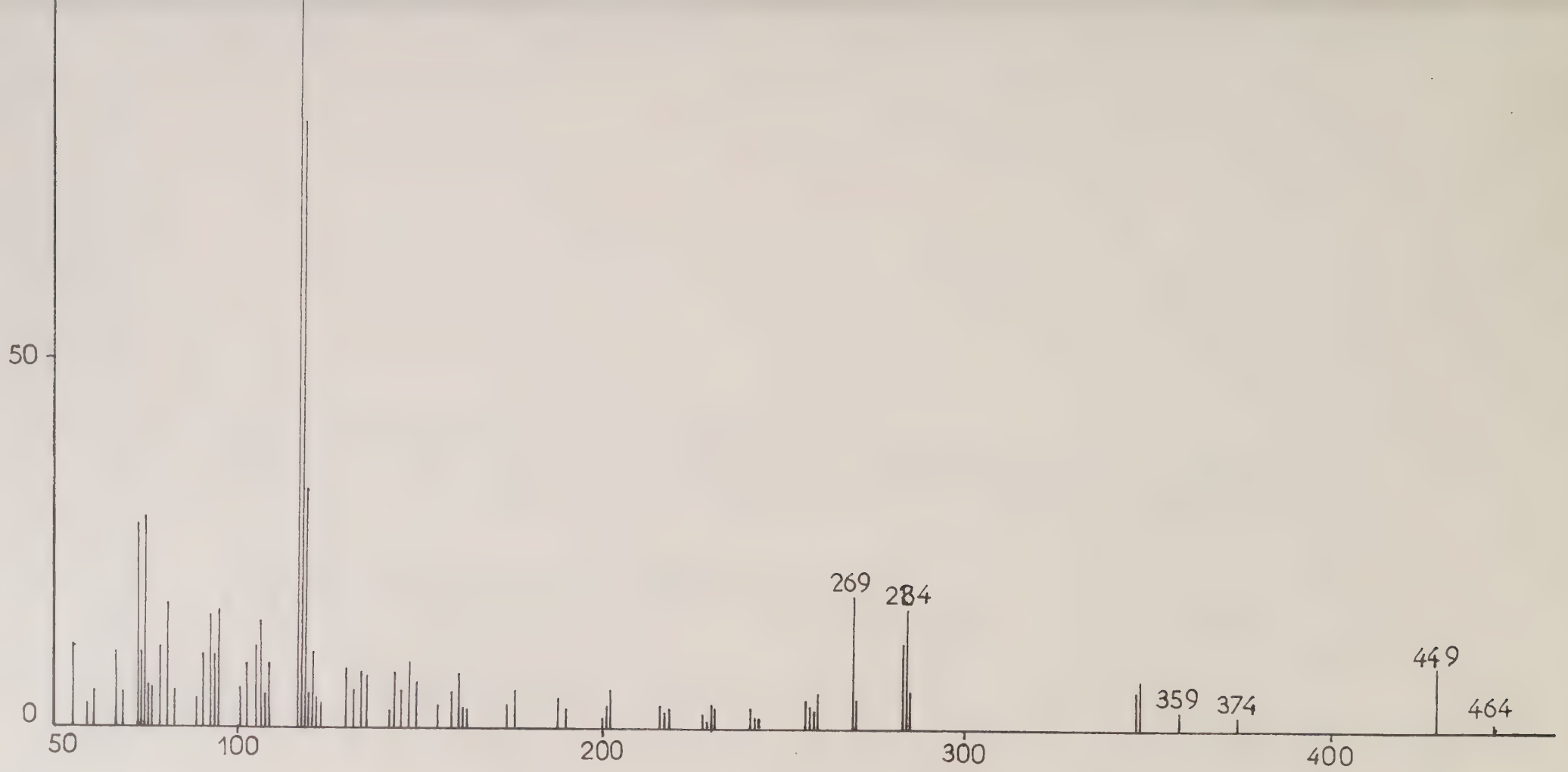
N° 24 : 5α-prégnane-3α,20α-diol (UM = 26,85 à 26,89)
séquence du SM : 117-269-359-449-464

N° 26 : 5β-prégnane-3α,20α-diol (UM = 27,04 à 27,26)
séquence du SM : 117-284-374-449-464

N° 33 : 5α-prégnane-3β,20α-diol (UM = 27,59)
séquence du SM : 117-449-464

Le spectre de masse de ces trois composés est caractéristique des prégnane-3,20-diol sous forme bis-triméthylsilylée : pic moléculaire M^+ = 464 objectivé par un pic à m/e = 449 (M-15). Le pic de base à m/e = 117 est typique des 20-hydroxy-21-désoxy-stéroïdes (169).

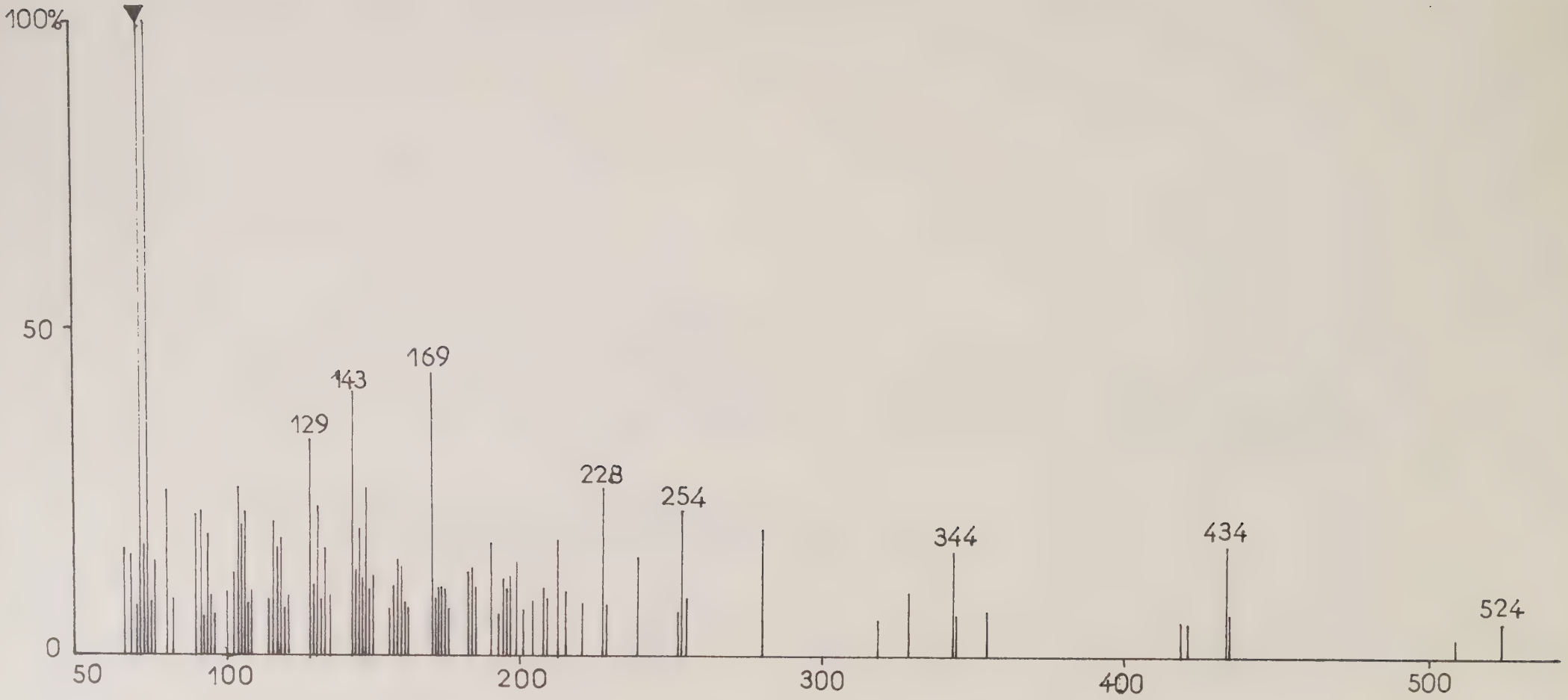
L'analyse par CGL a permis d'identifier chaque isomère en fonction de son UM.



Spectre de masse du 5α-prégnane-3α,20α-diol
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 24 : témoin f.5, UM =26,85)

N° 28 : 5ξ-androstane-3ξ,11β,17ξ-triol (UM =27,16)
séquence du SM :129-143-169-228-254-344-434-524

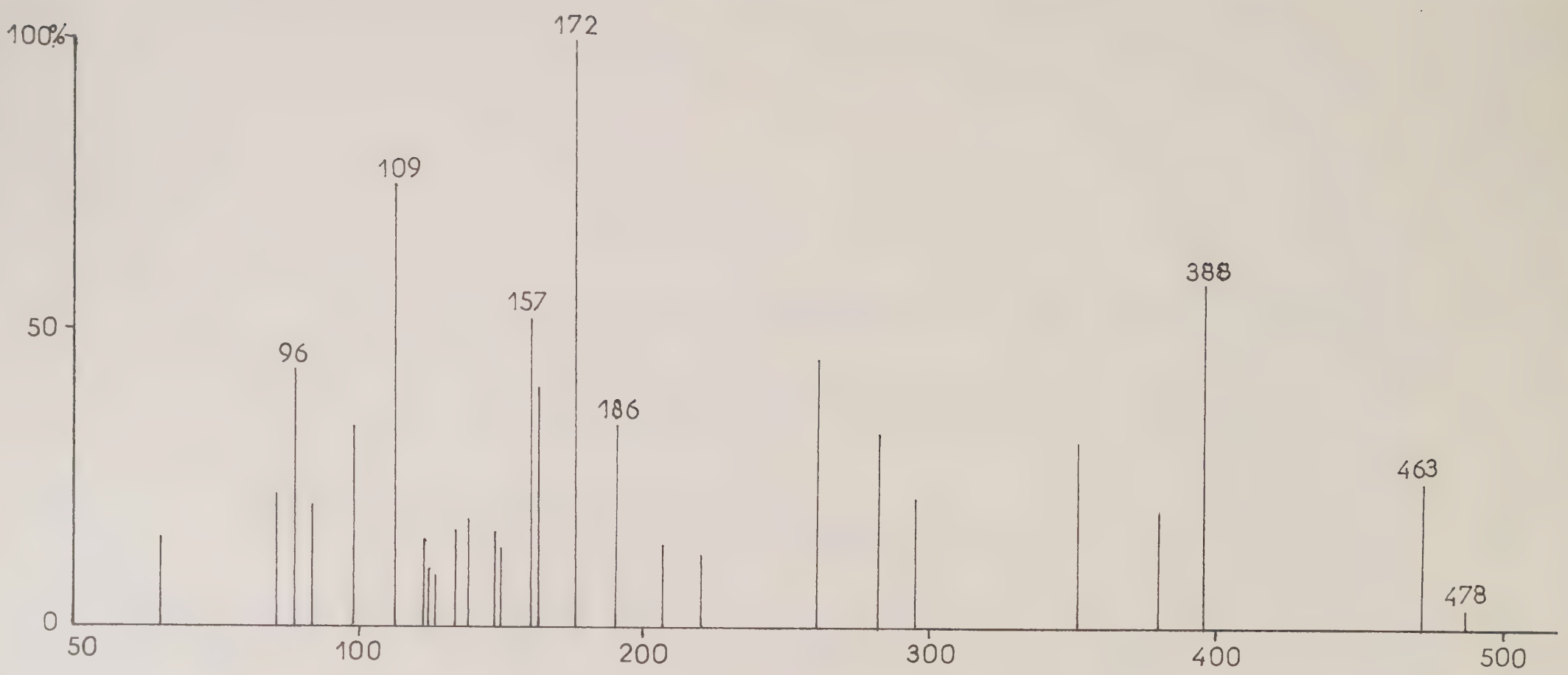
Le spectre de masse de ce composé, avec un pic moléculaire M^+ à m/e = 524 indique qu'il s'agit d'un androstane-3,X,17-triol sous forme tris-triméthylsilylée. Le pic de base à m/e = 169 affirme pour X la position 11β (13).



Spectre de masse du 5ξ-androstan-3ξ,11β,17ξ-triol
sous la forme de son dérivé tris-triméthylsilylé.
(composé n° 28 : ACTH f.8 à 11, UM = 27,16)

N° 29 : 3α,16α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one (UM =27,41)
séquence du SM : 96-109-172-186-298-388-478

Le pic moléculaire M^+ = 478 indique qu'il s'agit d'une dihydroxy-prégnan-20-one sous forme bis-triméthylsilyloxy. La séquence à m/e = 96, 109, 172, 186 est caractéristique des 3,16-dihydroxy-20-oxo-21-désoxystéroïdes (15), ce qui permet d'identifier , avec la CGL, ce composé à la 3α,16α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one.

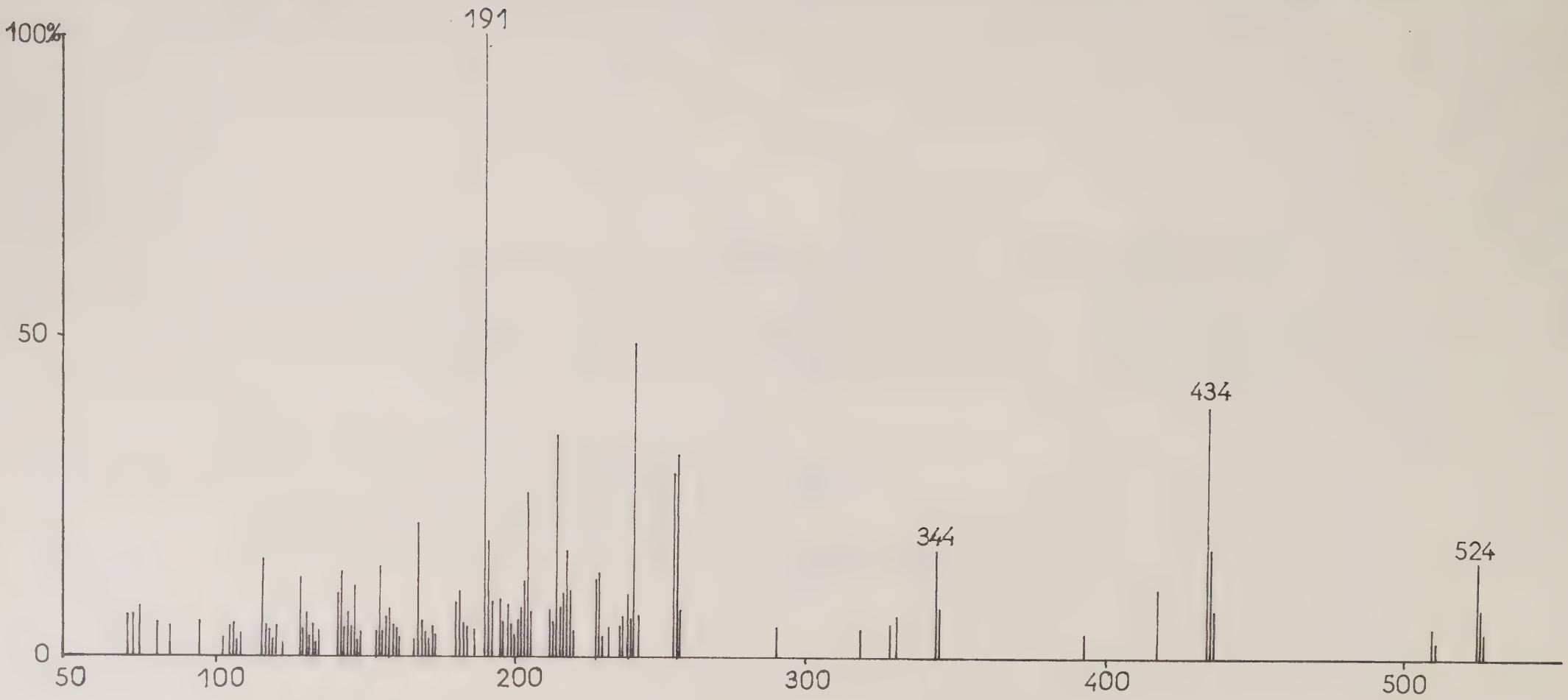


Spectre de masse de la 3α,16α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 29 : dectancyl f.5, UM = 27,41)

N° 30 : 5ξ-androstane-3ξ,16ξ,17ξ-triol (UM = 27,46)
séquence du SM : 191-329-344-419-434-509-524

Le pic moléculaire M^+ à m/e = 524 indique qu'il s'agit d'un androstane-triol sous forme tris-triméthylsilylée. Le pic de base à m/e = 191 est caractéristique des androstanes hydroxylés en 3, 16 et 17 (96).

En raison de son UM en CGL, l'identification de l'isomère n'a pas été possible.



Spectre de masse du 5ξ-androstane-3ξ,16ξ,17ξ-triol
sous forme de son dérivé tris-triméthylsilylé.
(composé n° 30 : ACTH f.8 à 11, UM = 27,46)

N° 39 : 5α-prégnane-3α,16α,20α-triol (UM = 28,30 à 28,39)
séquence du SM : 117-141-156-157-462-552

N° 48 : 5α-prégnane-3β,16α,20α-triol (UM = 29,56)
séquence du SM : 117-141-156-157-462-537 552

Le spectre de masse de ces deux composés présente un pic moléculaire M^+ à m/e = 552, indiquant qu'il s'agit d'un prégnane-triol sous forme tris-triméthylsilylée. La séquence à m/e = 117, 141, 156, 157, 462 est typique des prégnane-3,16,20-triol (78).

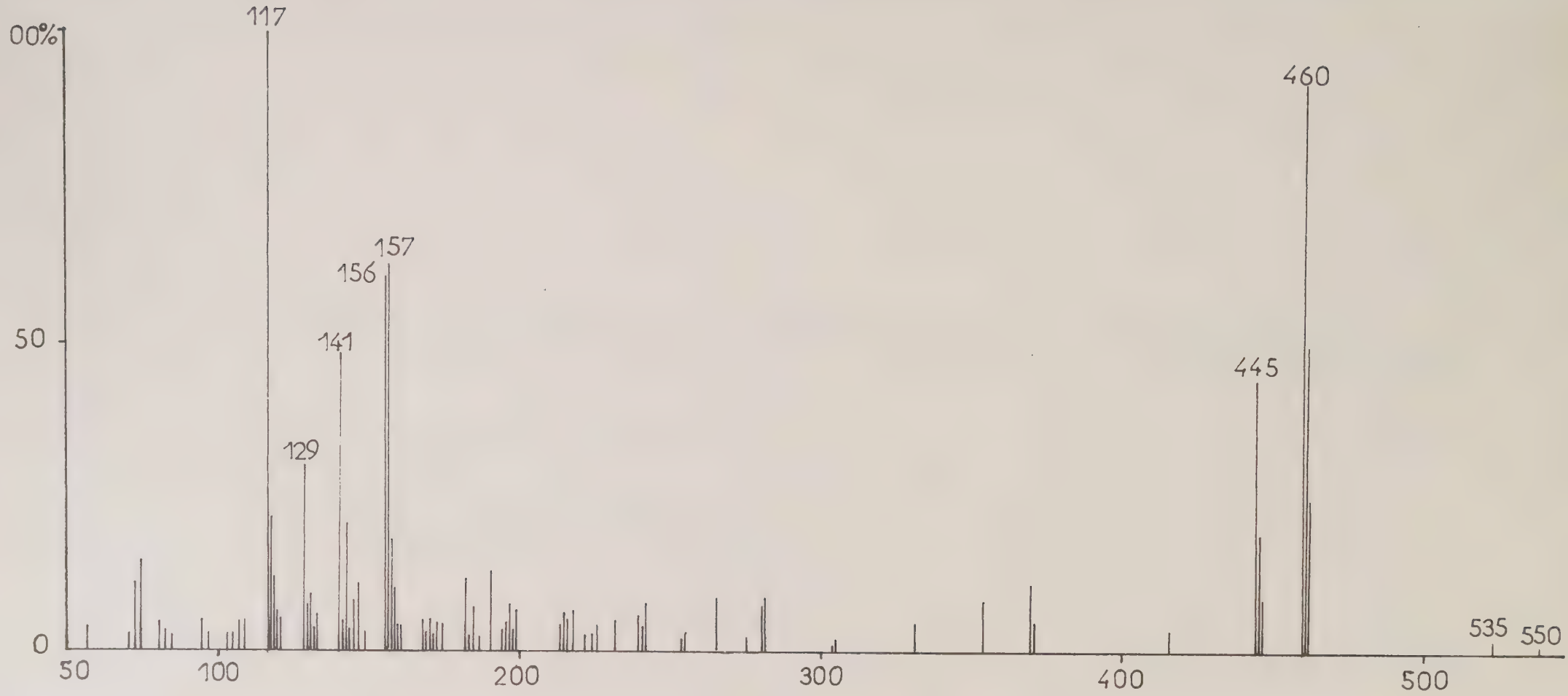
L'isomérisme de ces deus composés a été déterminée d'après l'étude en CGL.

SPECTRE DE MASSE NON REPRODUIT

N° 40 : 5-prégnène-3α,16α,20α-triol (UM = 28,20 à 28,39)
séquence du SM : 117-129-141-156-157-445-460-535-550

N° 47 : 5-prégnène-3ξ,16ξ,20ξ-triol (UM = 29,56)
séquence du SM : 117-129-141-156-157-445-460-535-550

Le pic moléculaire à m/e = 550, et la séquence à m/e = 117, 129, 141, 156, 157 et 460 identifie chacun de ces deux composés à un 5-prégnène-3,16,20-triol (81). L'isomérisme a pu être déterminé pour le composé n° 40 par l'étude en CGL.

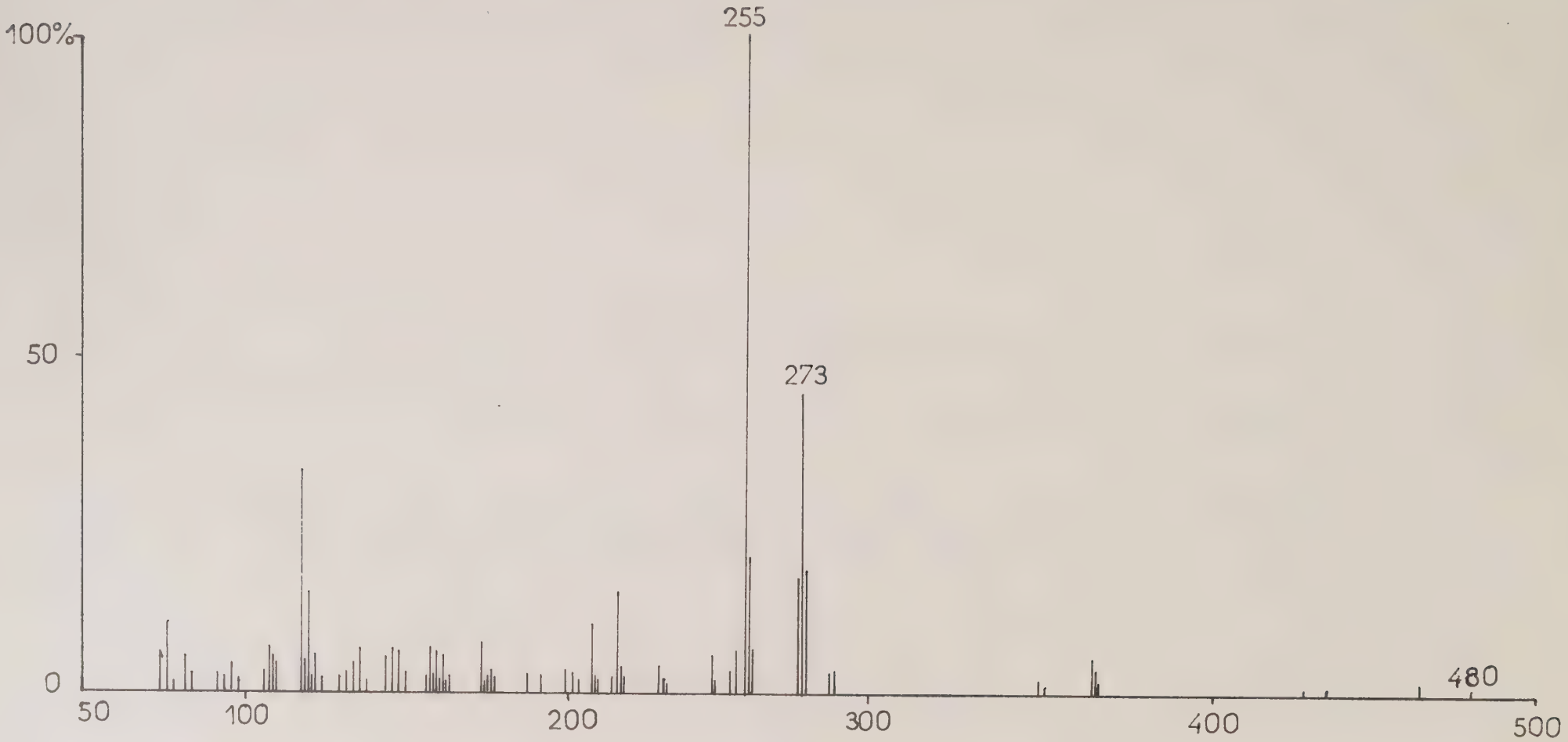


Spectre de masse du 5-prégnène-3α,16α,20α-triol
sous la forme de son dérivé tris-triméthylsilylé.
(composé n° 40 : témoin f.5, UM = 28,29)

N° 41 : 5ξ-prégnane-3α,17α,20β-triol (UM = 28,32)
séquence du SM : 215-255-273-390-465-480

N° 43 : 5β-prégnane-3α,17α,20α-triol (UM = 28,57 à 28,89)
séquence du SM : 215-255-273-435-480

Le spectre de masse du composé n° 43 est caractéristique du 5β-prégnane-3α,17α,20α-triol sous forme bis-triméthylsilyloxy (34). L'isomérisme du composé n° 41 n'a pas pu être déterminé.



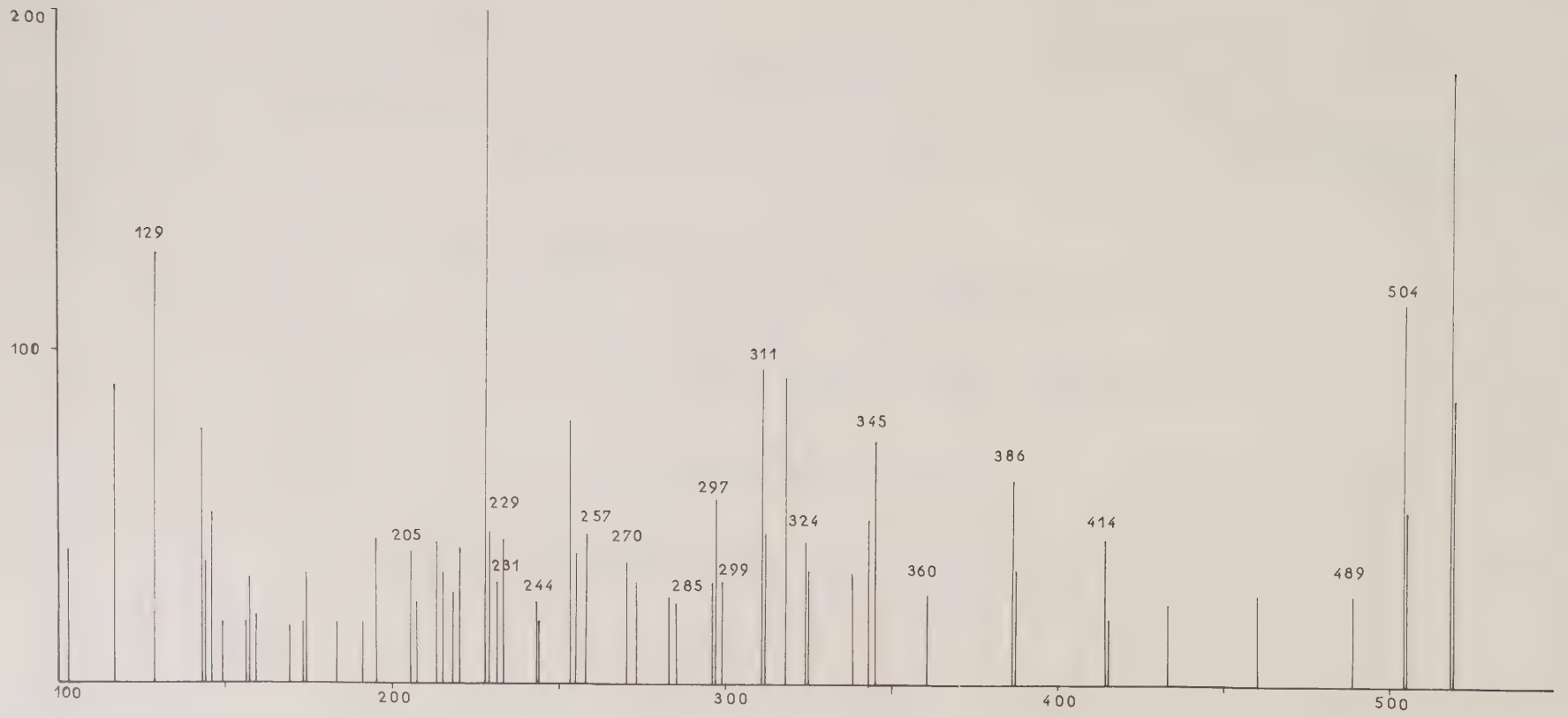
Spectre de masse du 5β-prégnane-3α,17α,20α-triol
sous forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 43 : témoin f.4, UM = 28,84)

N° 42 : estratriène-1,3,5(10)-3β, 16α, 17β-triol (UM = 28,44)

séquence du SM : 129-205-229-231-244-257-270-285-297-299-311-324-345-360-386-414-489-504

La séquence de ce spectre de masse indique qu'il s'agit d'un dérivé tris-triméthylsilyloxy de l'estriol (116).

Le spectre de masse présenté page 164 comporte, outre l'estriol, un autre composé qu'il n'a pas été possible d'identifier.



Spectre de masse de l'estratriène-1,3,5(10)-3β,16α,17β-triol (estriol)
sous la forme d'un dérivé tris-triméthylsilylé.
(composé n° 42 : ACTH f.12 à 14, UM =28,44)

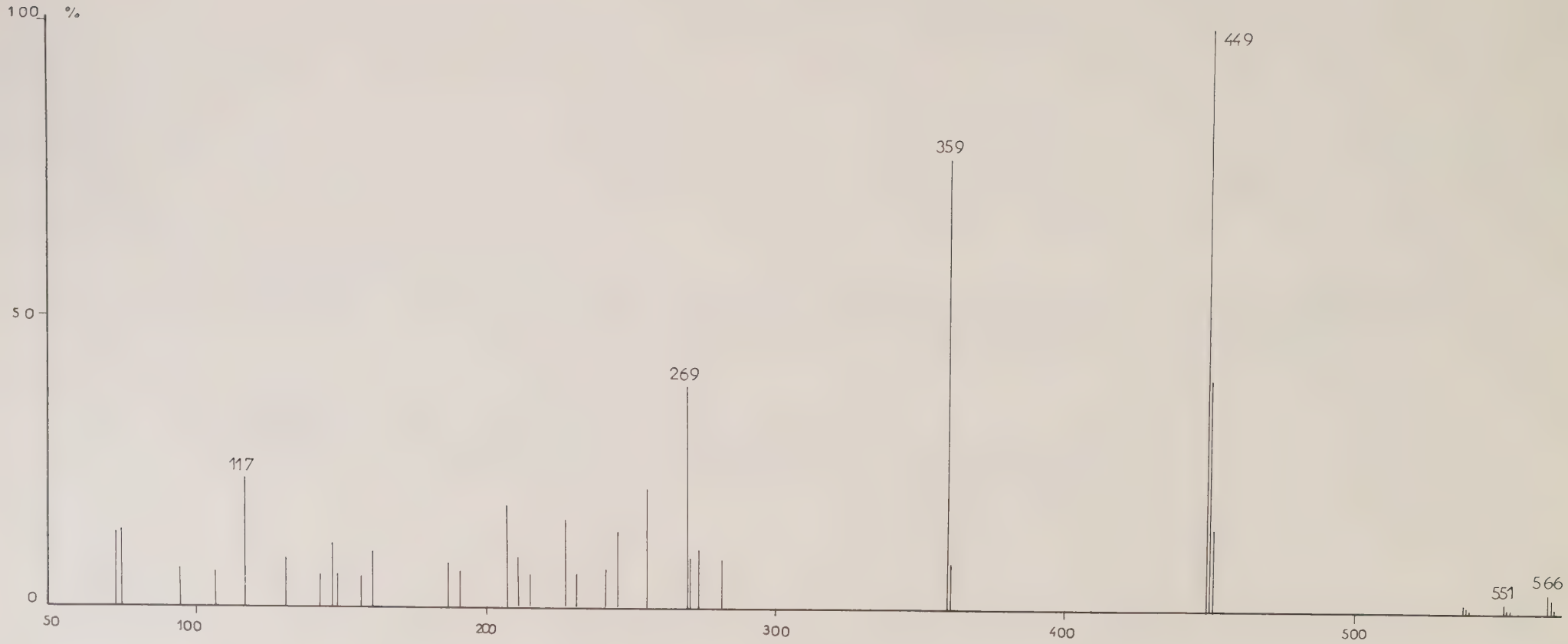
N° 25 : 3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one (UM = 26,91)
séquence du SM : 269-359-449-566

N° 44 : 3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one (UM = 28,43 à 28,59)
séquence du SM : 117-269-359-449-566

N° 49 : 3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one (UM = 30,37)
séquence du SM : 117-269-359-449-566

N° 57 : 3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one (UM = 32,00)
séquence du SM : 117-269-359-449-566

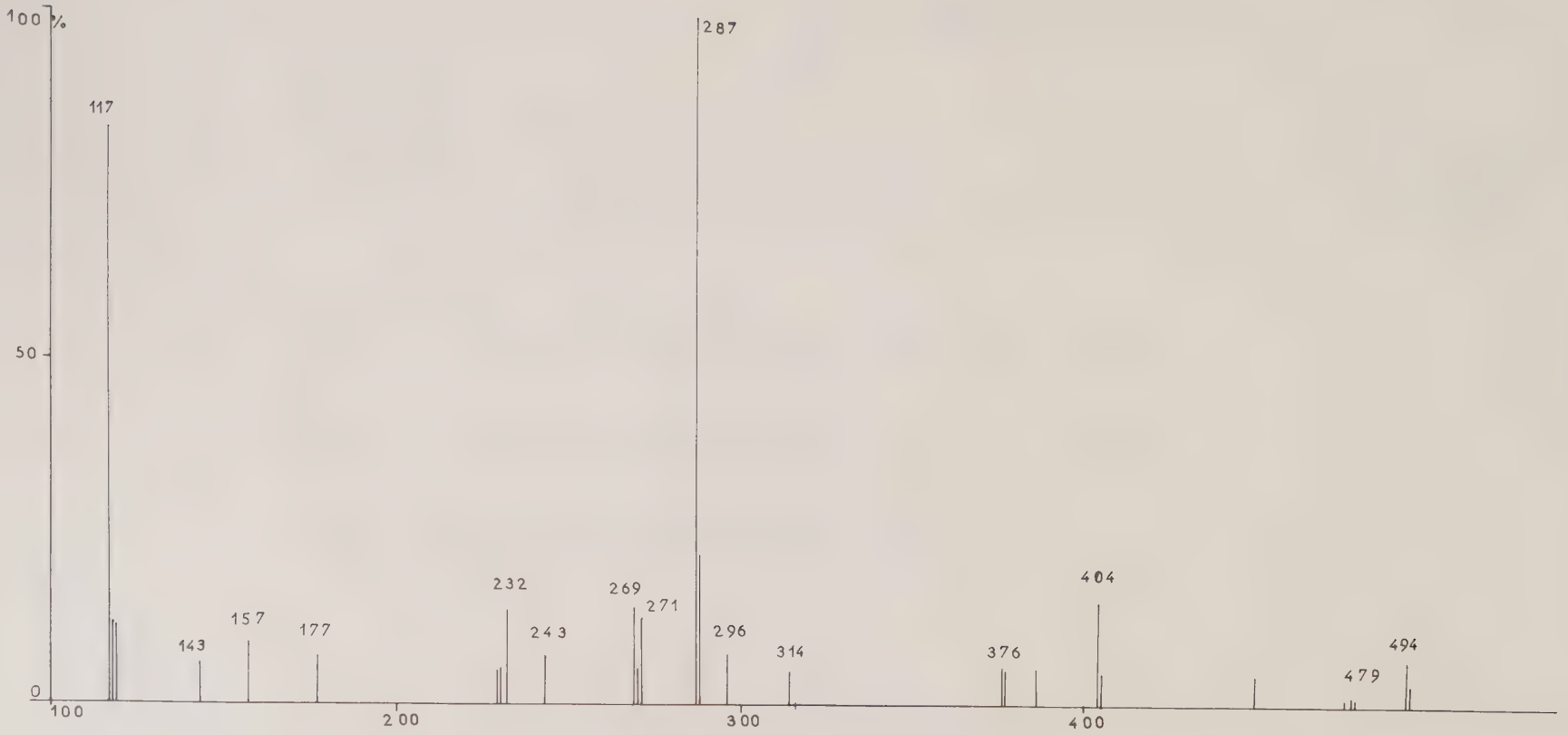
Le spectre de masse de ces quatre composés est caractéristique des 3,17,20-trihydroxy-prégnan-11-one sous forme tris-triméthylsilyloxy. Remarquons ici que l'hydroxyle en 17 est silylé. L'étude par CGL a permis d'identifier le composé n° 49 à la 3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one.



Spectre de masse de la 3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one
sous la forme de son dérivé tris-triméthylsilylé.
(composé n°49 : ACTH f.8 à 11, UM = 30,37)

N°49 : 3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one (UM = 29,68 à 29,96)
séquence du SM : 117-287-404-479-494

La séquence de ce spectre de masse est typique de la 3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one sous la forme de son dérivé 3,20-bis-triméthylsilyloxy (33). L'hydroxyle en 17 n'est donc pas silylé.



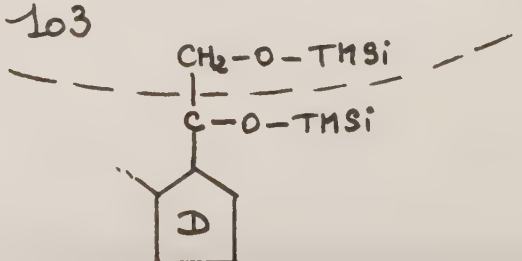
Spectre de masse de la 3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one
sous la forme de son dérivé 3,20-bis-triméthylsilylé.
(composé n° 49 : témoin f.7, UM = 29,68)

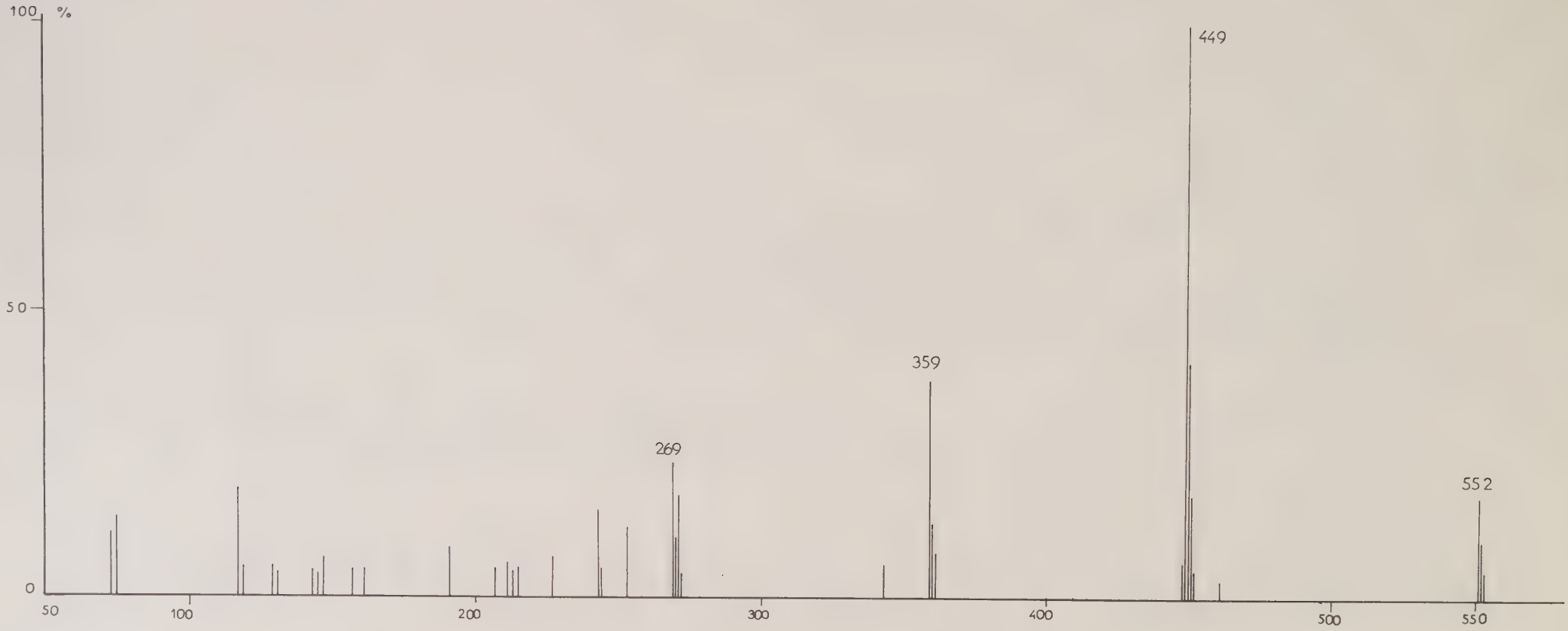
N° 45 : 5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol (UM = 28,61 à 28,74)
séquence du SM : 269-359-449-552

N° 52 : 5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol (UM = 30,14 à 30,18)
séquence du SM : 117-269-359-449-552

N° 55 : 5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol (UM = 30,29 à 30,31)
séquence du SM : 359-361-449-552

Le spectre de masse de ces trois produits présente un pic moléculaire M^+ = 552, indiquant qu'il s'agit d'un prégnane-triol tris-triméthylsilylé. Le pic de base à m/e =449 (M-103) affirme qu'il s'agit d'un prégnane-3,20,21-triol (168) ainsi que le montre le schéma de fragmentation ci-dessous.





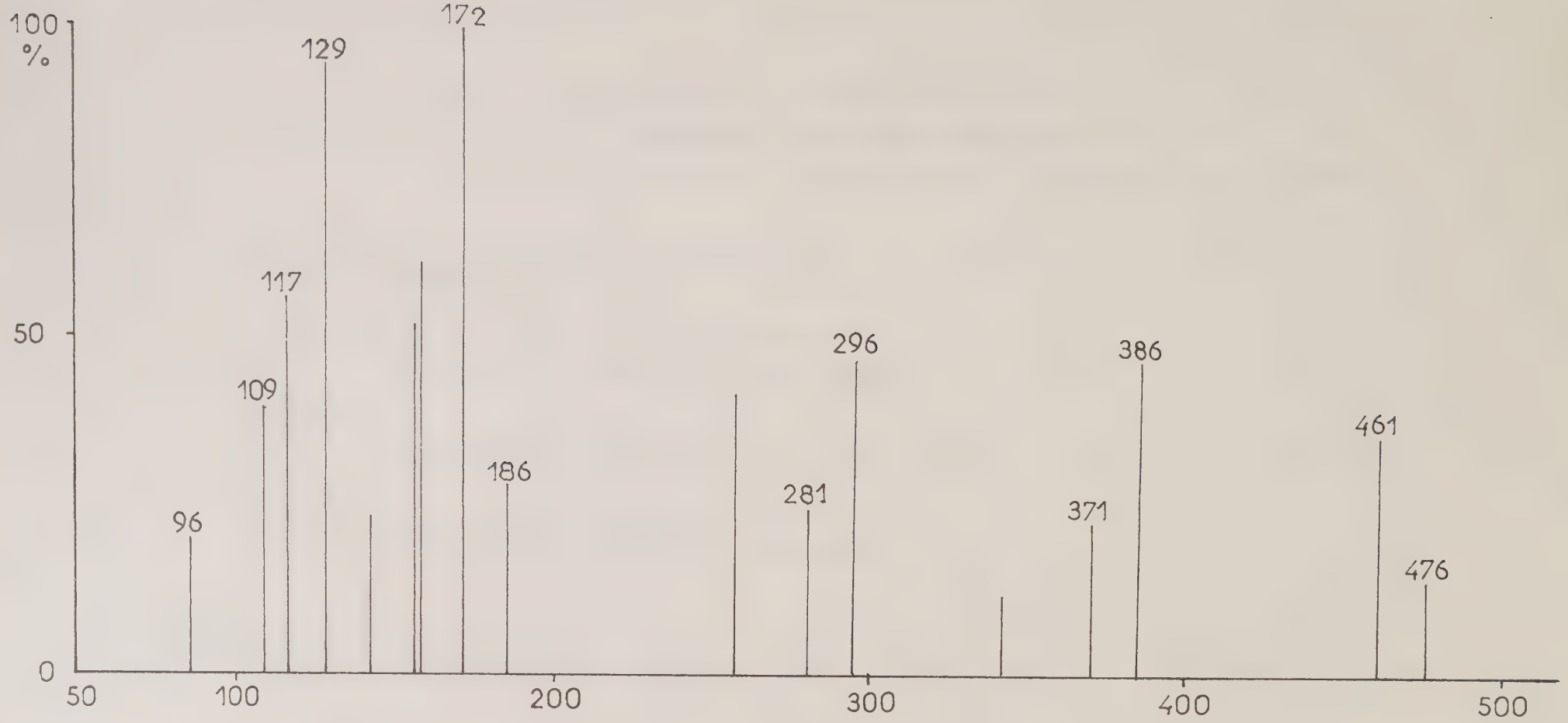
Spectre de masse du 5ξ-prégnane-3ξ,20ξ-21-triol
sous la forme de son dérivé tris-triméthylsilylé.
(composé n° 52 : témoin f.7, UM = 30,18)

N° 46 : 3β,16α-dihydroxy-5-prégnen-20-one (UM = 28,66)

séquence du SM : 96-109-117-129-172-186-371-386-461-476

Le pic à m/e = 129 indique qu'il s'agit d'un 3β-hydroxy-5-ène-stéroïde, rapporté à une 3,X-dihydroxy-5-prégnen-20-one par le pic moléculaire M^+ à m/e = 476. La séquence à m/e = 96, 109, 172 et 186 indique que ce composé est hydroxylé en 16 (33).

Il est identifié par CGL à la 3β,16α-duhydroxy-5-prégnen-20-one.



Spectre de masse de la 3β,16α-dihydroxy-5-prégnen-20-one
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 46 : ACTH f.8 à 11, UM = 28,66)

N° 51 : 5-prégnen-3ξ,17α,20ξ-triol (UM = 29,85)
séquence du SM : 253-271-343-433-478

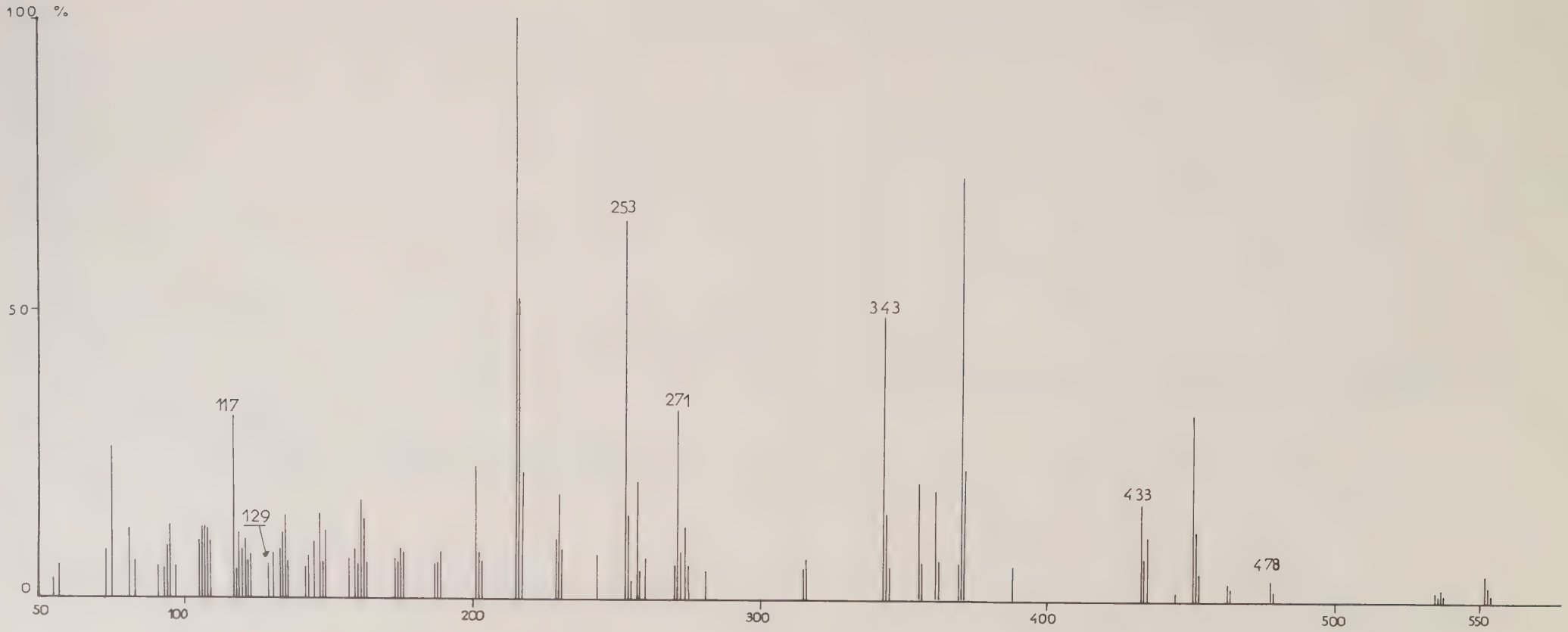
N° 54 : 5-prégnen-3ξ,17α,20ξ-triol (UM ∓ 30,29 à 30,31)
séquence du SM : 117-253-271-361-478

N° 50 : 5-prégnen-3β,17α,20α-triol (UM = 29,80)
séquence du SM : 117-215-253-271-343-433-478

N° 53 : 5-prégnen-3ξ,17α,20ξ-triol (UM = 30,16)
séquence du SM : 117-129-253-271-343-433-478

A deux unités de masse près, ces spectres sont identiques à celui du prégnane-3,17,20-triol, et typique des 5-prégnen-3,17α,20-triol non silylés en 17 (97).

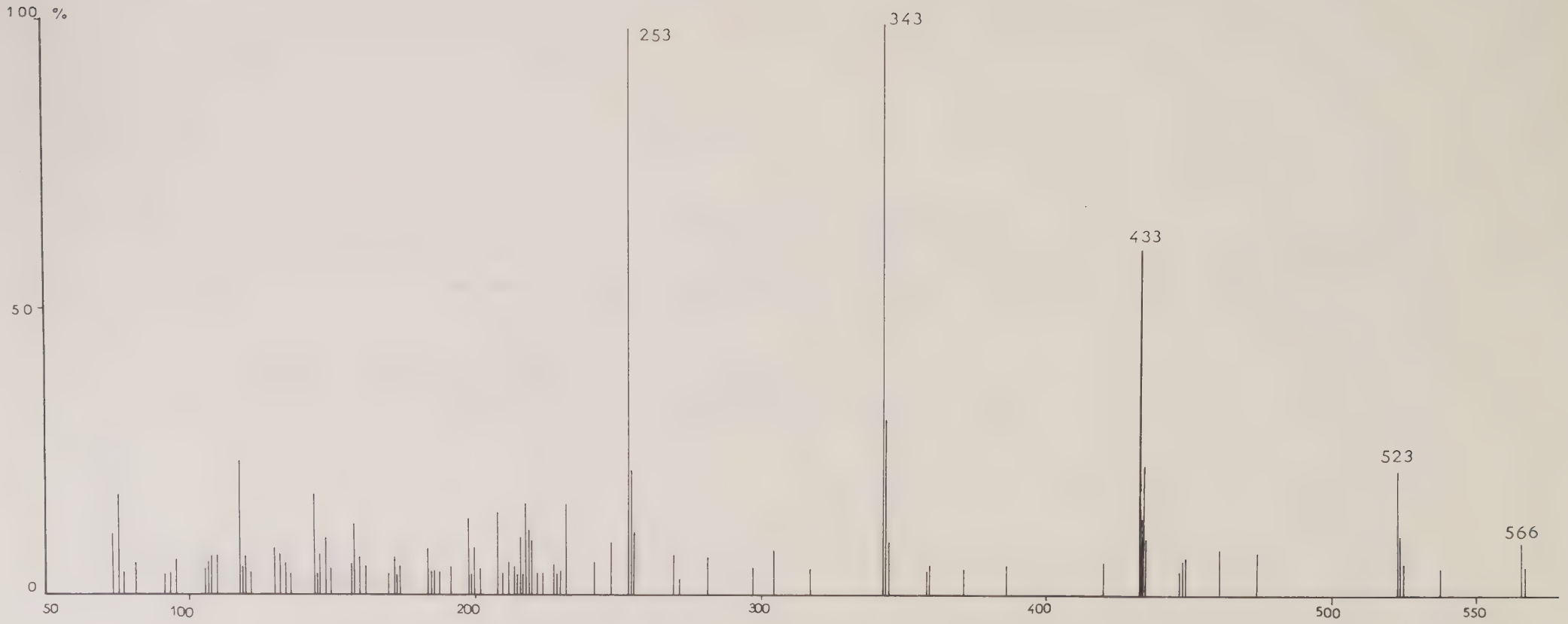
Par CGL, seul le composé n° 50 a pu être identifié.



Spectre de masse du 5-prégnen-3β,17α,20α-triol
sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.
(composé n° 50 : ACTH f.6, UM = 29,80)

N° 36 : trihydroxy-prégnan-mono-one (UM = 27,87)
séquence du SM ; 253-343-433-523-566

Le pic moléculaire M^+ = 566 indique qu'il s'agit d'une trihydroxy-prégnan-mono-one, sans qu'il nous ait été possible d'identifier ce composé.

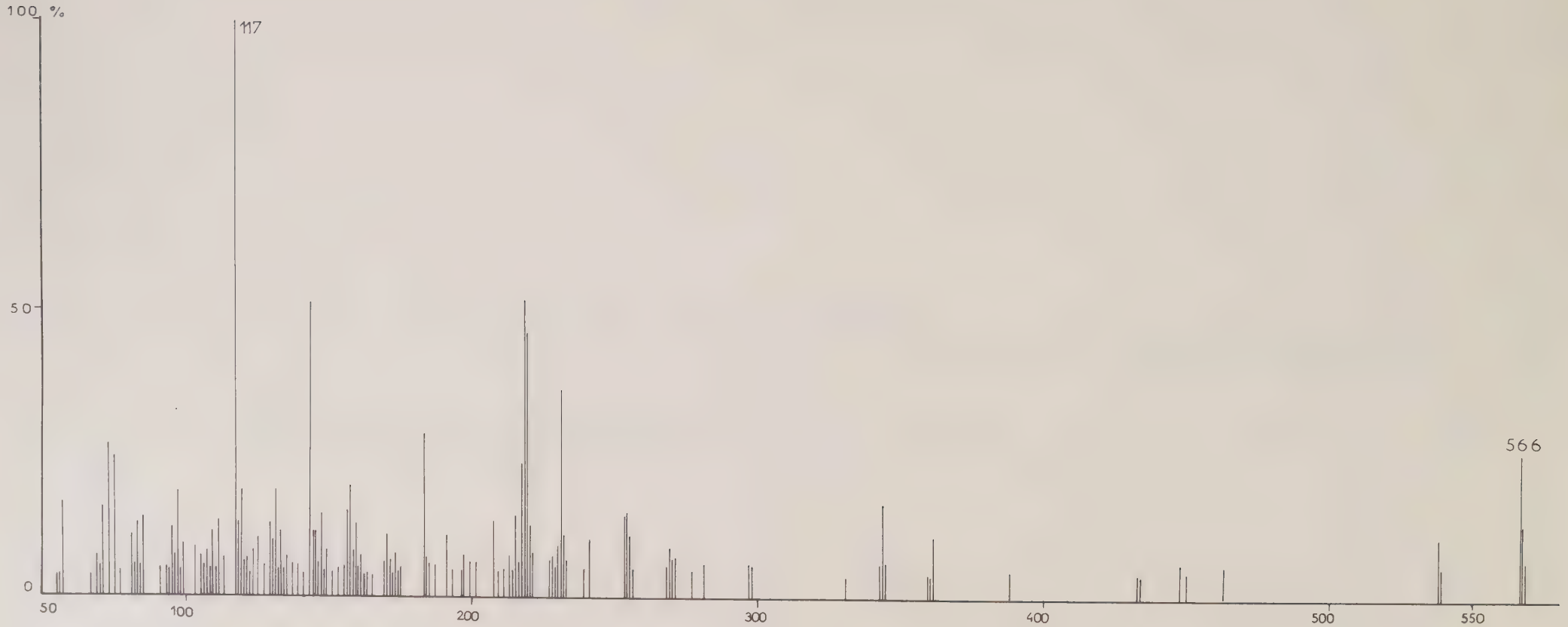


Spectre de masse de la trihydroxy-prégnan-mono-one
sous la forme de son dérivé tris-triméthylsilylé.
(composé n° 36 : dectancyl f.6, UM = 27,87)

N° 37 : X,Y,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-mono-one (UM = 27,98)

séquence du SM : 117-566

La présence d'un pic moléculaire M^+ à m/e = 566 indique qu'il s'agit d'une X,Y,Z-trihydroxy-prégnan-mono-one. La présence d'un pic de base à m/e = 117 indique pour Z la position 20, la présence d'un hydroxyle en 21 étant exclue.

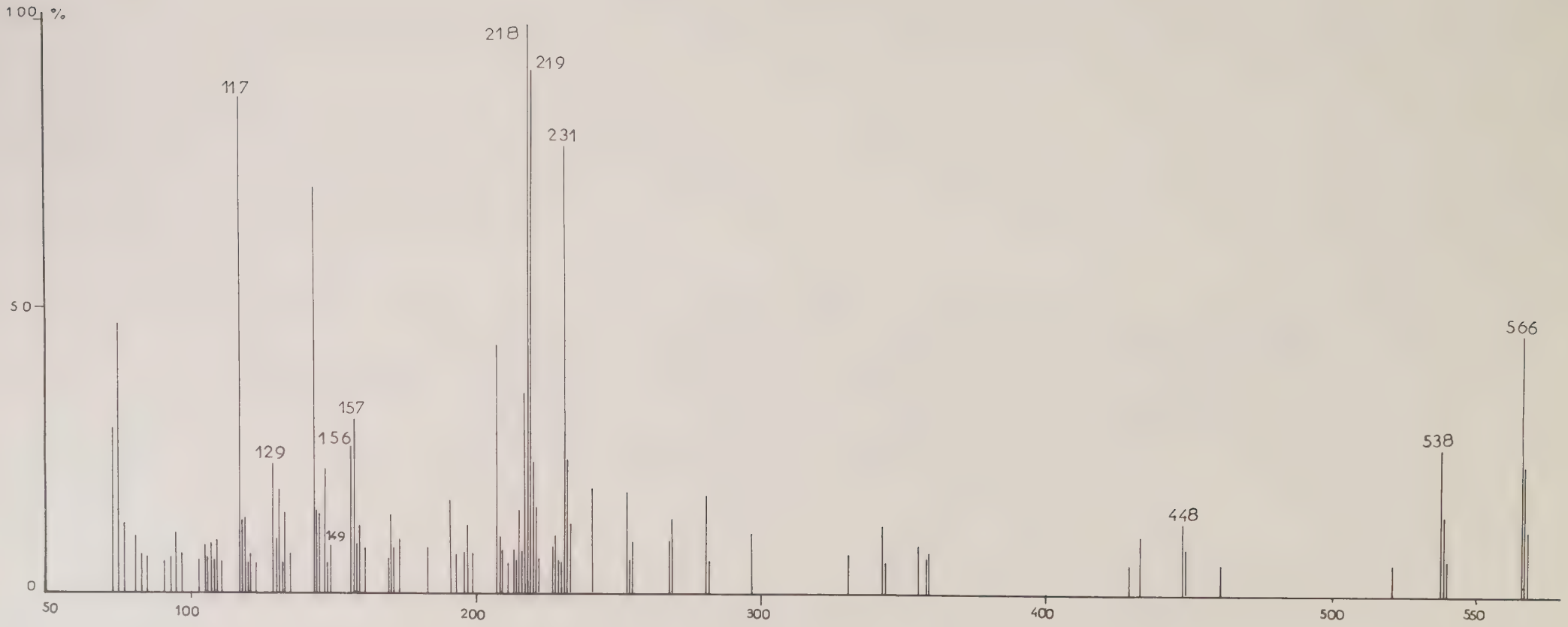


Spectre de masse de la X,Y,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-mono-one
sous la forme de son dérivé tris-triméthymsilylé.
(composé n° 37 : témoin f.4, UM = 27,98)

N° 38 : trihydroxy-prégnan-mono-one (UM = 28,03)

séquence du SM : 117-129-149-156-157-218-219-231-448-538-566

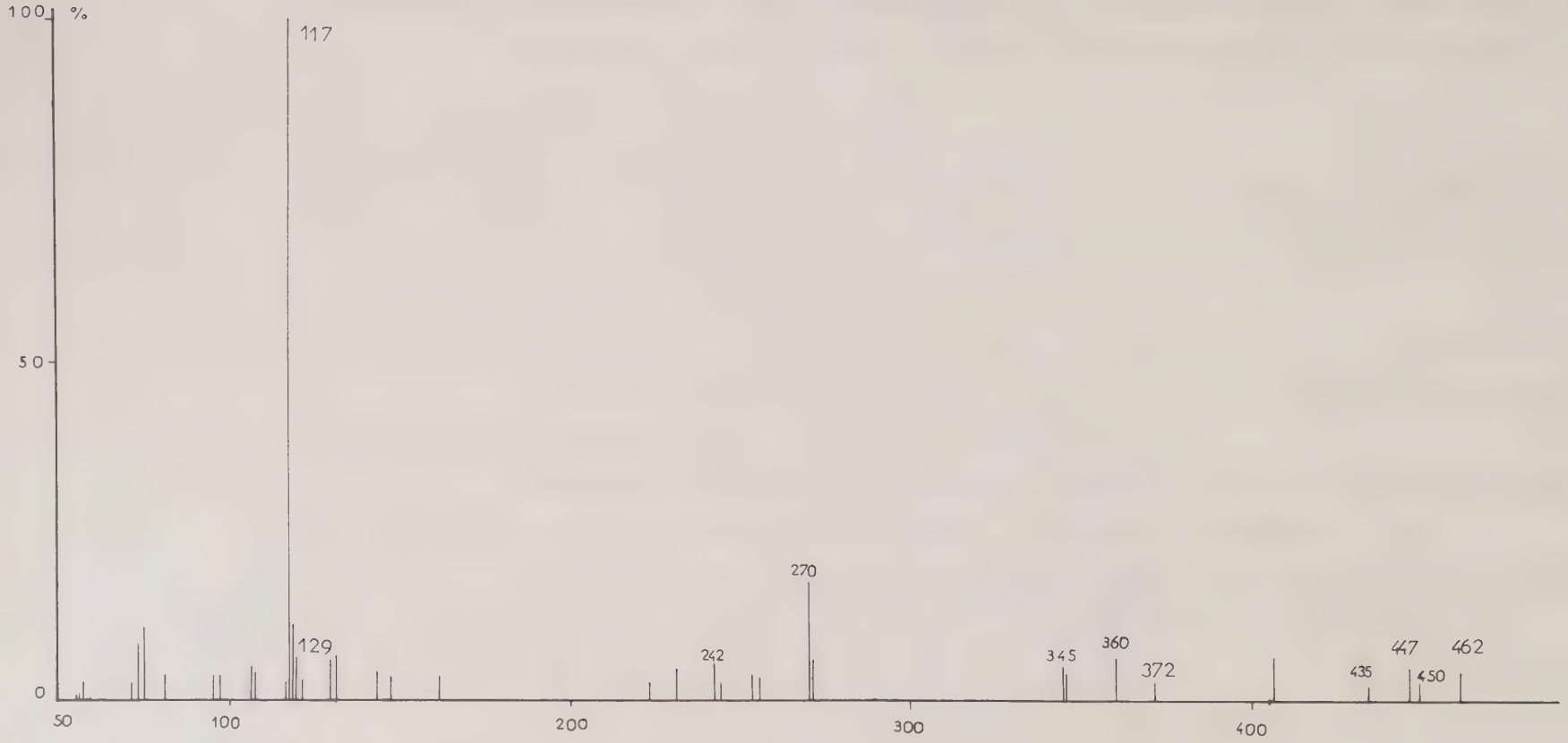
Le pic moléculaire M^+ = 566 indique qu'il s'agit d'une trihydroxy-prégnan-mono-one sans qu'il nous ait été possible d'identifier ce composé.



Spectre de masse de la trihydroxy-prégnan-mono-one
sous la forme de son dérivé tris-triméthylsilylé.
(composé n° 38 : dectancyl f.6, UM = 28,03)

Ce spectre correspond au mélange de deux composés :

- le composé n° 10 : 5-prégnène-3α,20ξ-diol sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé, identifiable d'après la séquence 117-129-372-447-462 (cf P. 146')
- le composé n° 11 : 3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé, identifié par la séquence 242-270-345-360-435-450 (cf p. 147').



Spectre de masse du pic d'UM = 25,37 (témoin f.4)

Ce spectre de masse correspond au mélange d'au moins trois produits.

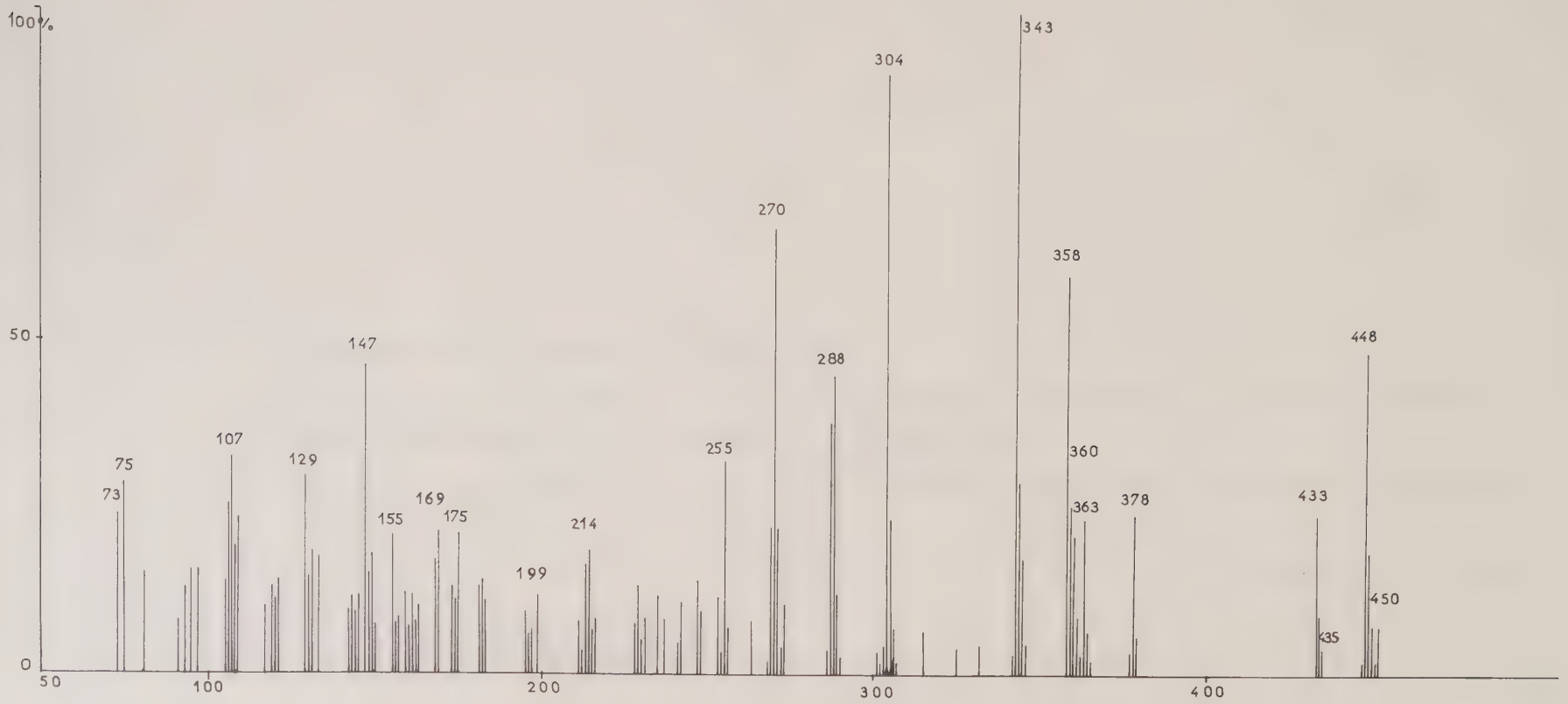
La séquence 304-343-358-433-448 permet d'identifier la 3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione sous la forme de son dérivé énol-triméthylsilylé (cf p.144'). (composé n° '12).

La séquence 270-360-435-450 permet d'identifier la 3α,7α-dihydroxy-5β-androstan-17-one sous forme bis-triméthylsilylée (cf p.147'). (composé n° 17).

La séquence 288-363-378 est caractéristique des 3,11β-dihydroxy-androstan-17-one sous la forme de leur dérivé 3-mono-triméthylsilylé (forme non silylée en 11). Ce composé est identifié par CGL à la 3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one.

Enfin, la séquence 199-214-304-358-433-448 permet de suspecter, au niveau de ce spectre de masse, la présence d'une 3,16-dihydroxy-5-androsten-17-one, identifiée par CGL à la 3α,16α-dihydroxy-5-androsten-17-one. On ne peut formellement l'affirmer, le pic de base à m/e = 304 pour cette séquence pouvant uniquement faire partie de la séquence du composé n° '12.

Par analogie avec ce composé (n°13), on peut identifier, au niveau du pic d'UM = 27,74 de la fraction f.5 du Dectancyl (spectre non reproduit), la 3β,16α-dihydroxy-5-androsten-17-one sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé ; séquence 129-199-214-304-343-433-448, le pic à m/e =129 affirmant la position en 3β de l'hydroxyle en 3.

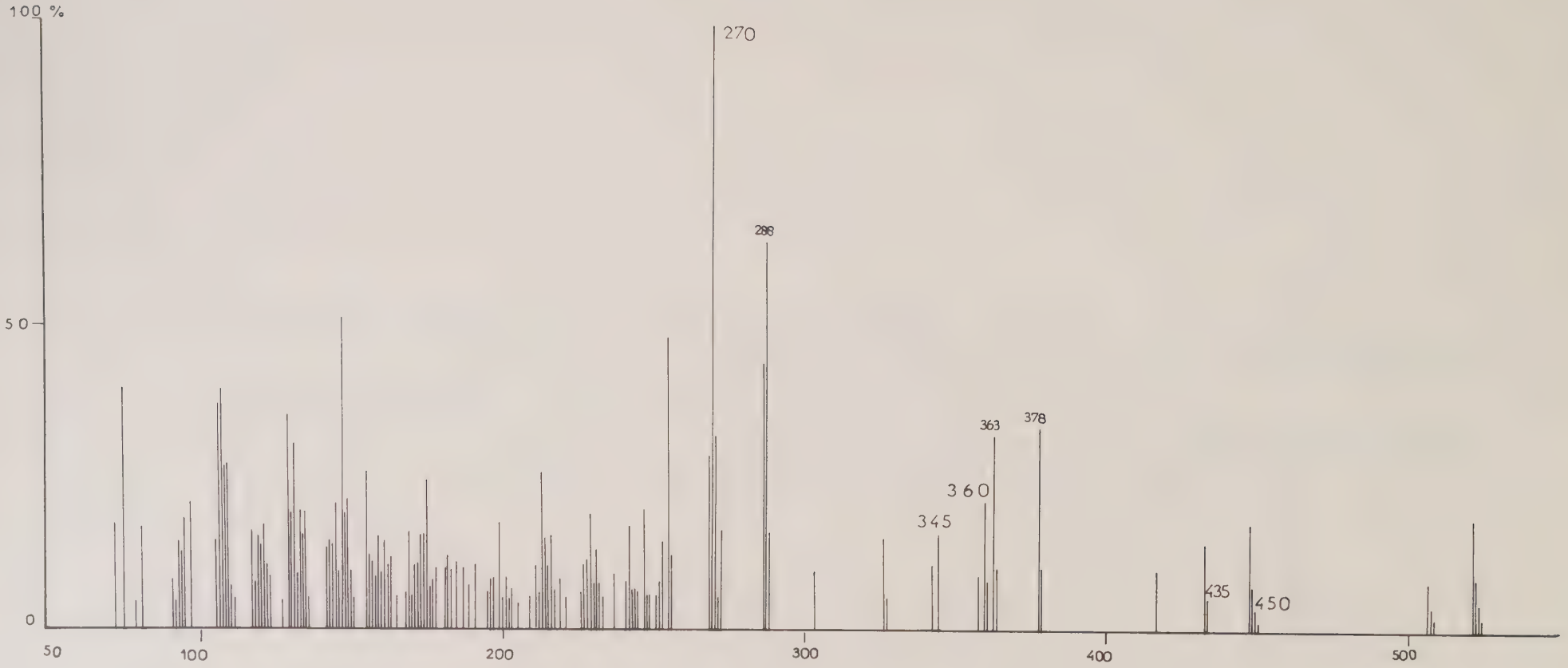


Spectre de masse du pic d'UM = 25,75 (témoin f.4)

Ce spectre de masse comporte la mélange de deux des composés présents dans le spectre reproduit p. 174 :

le composé n° 17 : 3α,7α-dihydroxy-5β-androstan-17-one sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé (séquence : 270-360-435-450).

le composé n° '19 : 3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one sous forme mono-triméthylsilylée (séquence : 288-363-378).

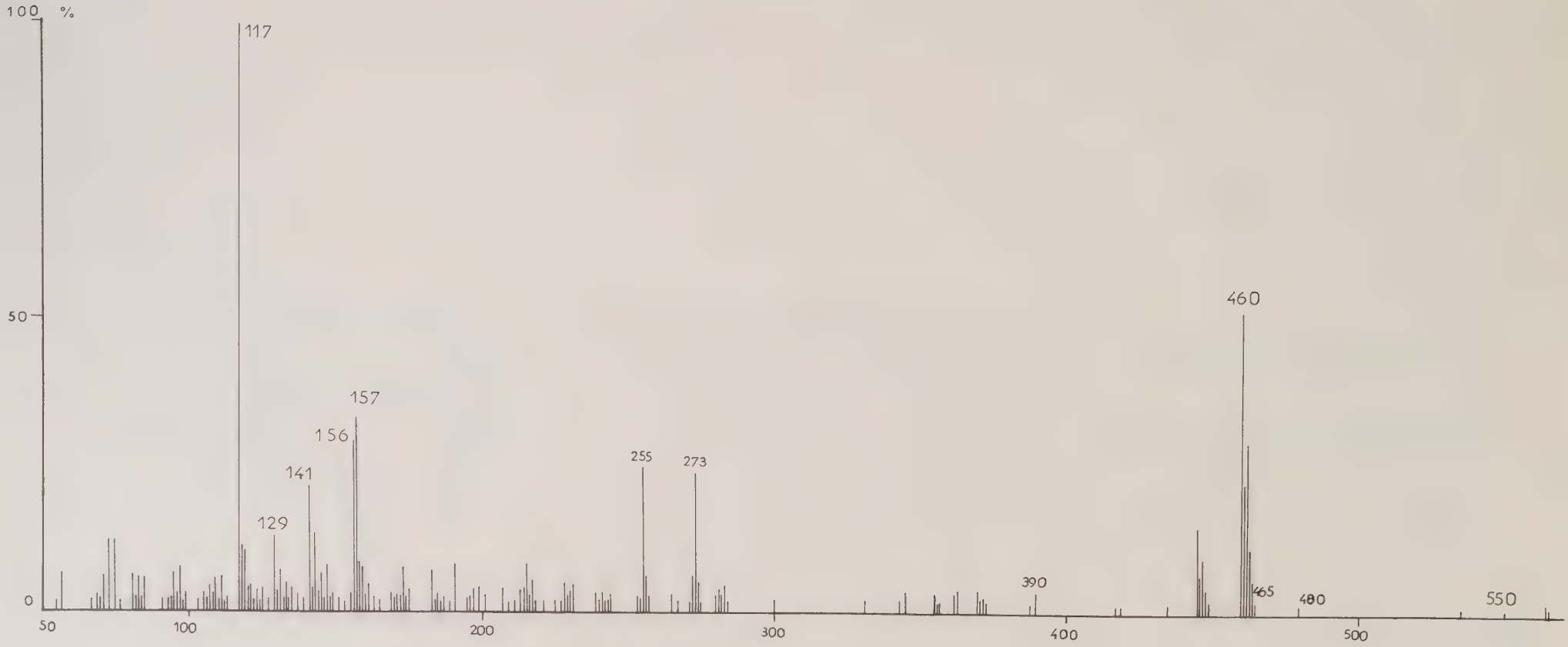


Spectre de masse du pic d'UM =25,73 (témoin f.5)

Ce spectre de masse correspond au mélange de deux composés :

le composé n° 40 : 5-prégnène-3α,16α,20α-triol sous forme tris-triméthylsilylée, identifié d'après sa séquence à m/e = 117-129-141-156-157-460-550 (cf p.162')

le composé n° 41 : 5ξ-prégnane-3α,17α,20β-triol sous forme bis-triméthylsilylée, évoqué d'après la séquence 215-255-273-390-465-480 (cfp.163').

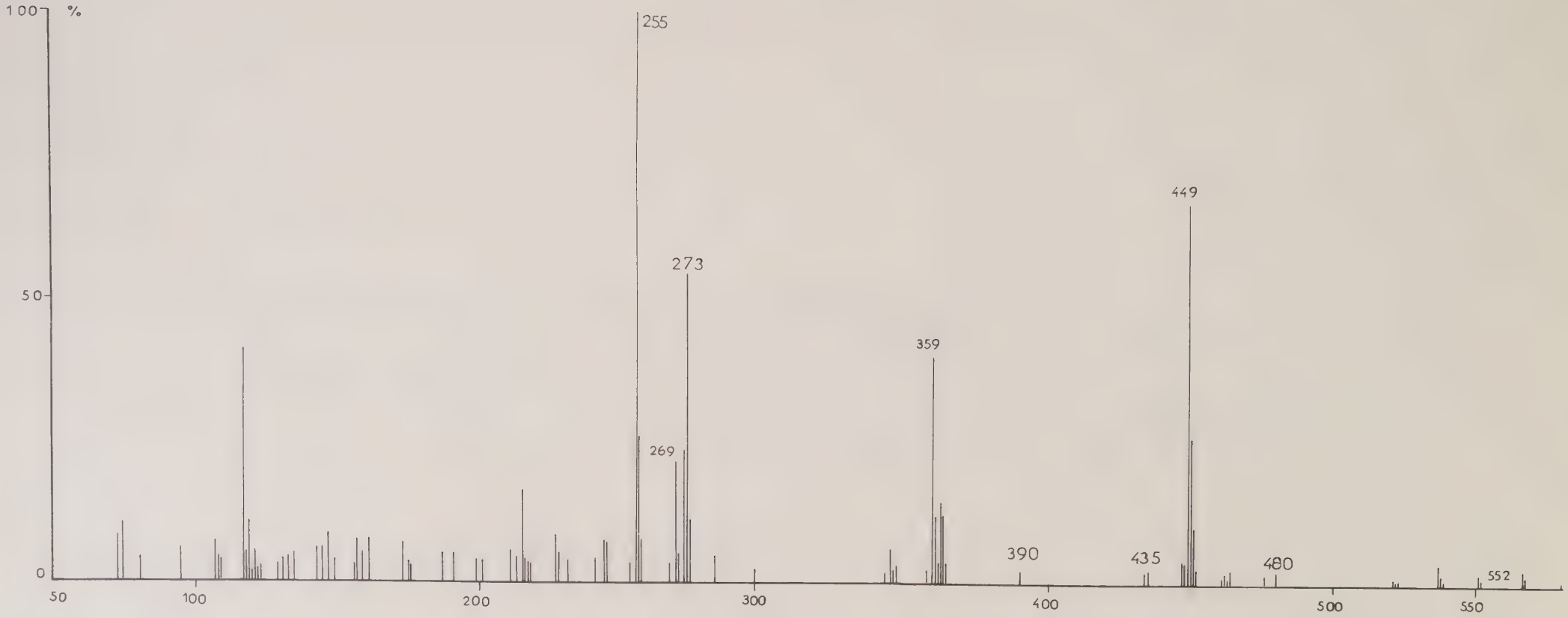


Spectre de masse du pic d'UM = 28,32 (témoin f.4)

Dans ce spectre de masse , on peut individualiser les séquences des SM des composés suivants :

Composé n° 43 :215-255-273-435-480, séquence caractéristique du 5β-prégnane-3α,17α,20α-triol (cf p. 163') sous la forme de son dérivé bis-triméthylsilylé.

Composé n° 45 : 269-359-449-552, séquence caractéristique d'un 5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol sous la forme de son dérivé tris-triméthylsilylé (cf p.167').

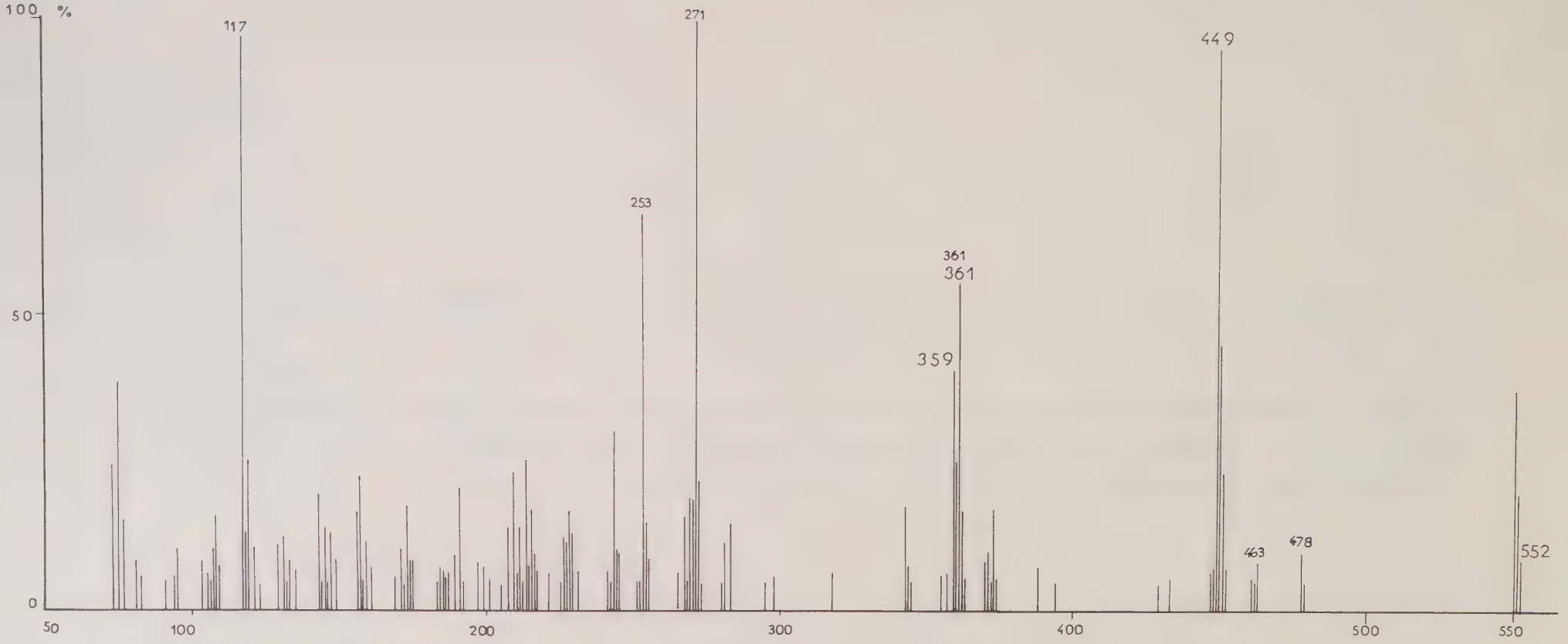


Spectre de masse du pic d'UM = 28,61 (témoin f.6)

Ce spectre de masse correspond au mélange des deux composés suivants :

Composé n° 54 : séquence à m/e = 117-253-271-361-463-478 caractéristique d'un 5-prégnène-3ξ,17α,20ξ-triol sous forme bis-triméthylsilylée (cf p.169').

Composé n° 55 : séquence à m/e = 359-361-449-552 caractéristique d'un 5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol sous forme tris-triméthylsilylée (cf p.167').

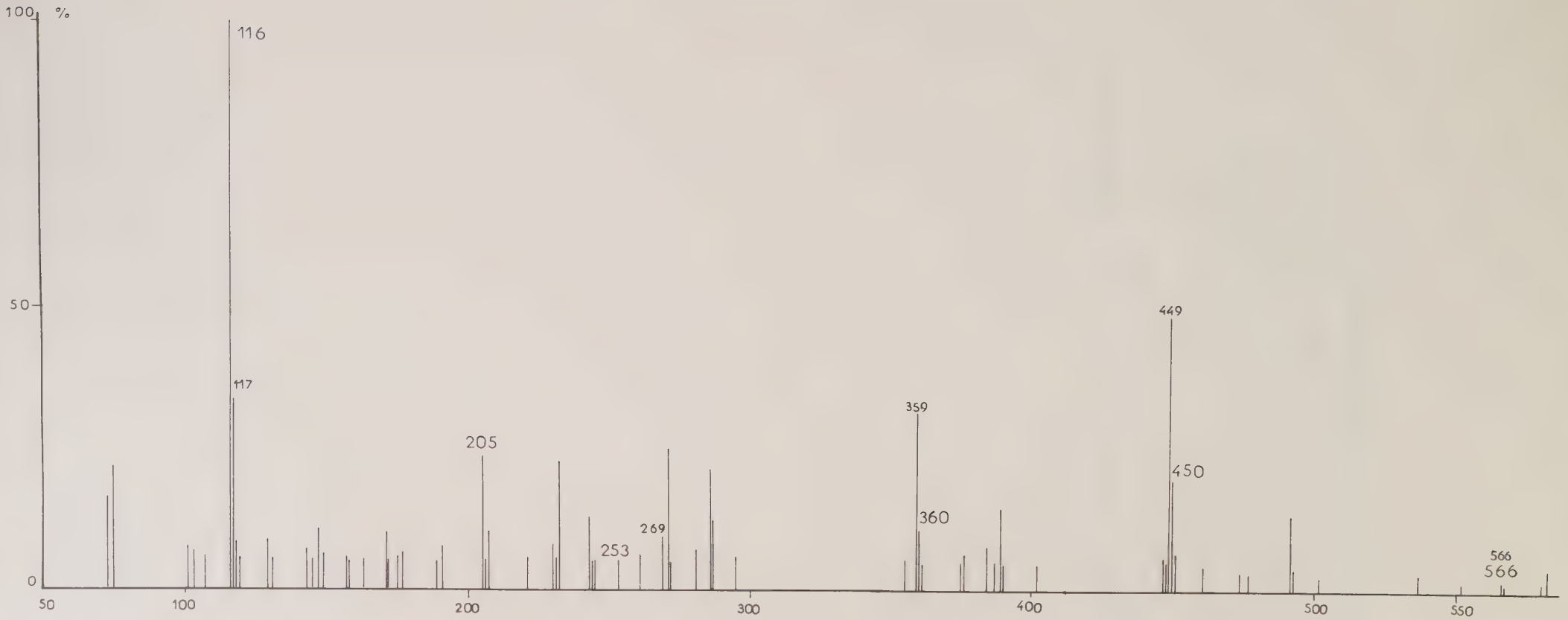


Spectre de masse du pic d'UM = 30,31 (témoin f.6)

Au niveau de ce spectre de masse, on peut décrire la séquence de deux composés :

La séquence à m/e =116-205-253-360-433-450-476-566 est identique à celle du spectre de masse du β-cortol persilylé (5). Ce produit est donc identifié au 5β-prégnane-3α,11β,17α,20β,21-pentol.

La séquence à m/e = 117-269-359-449-566 est caractéristique d'une 3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one sous la forme de son dérivé tris-triméthylsilylé (cf p.165').



Spectre de masse du pic d'UM = 32,00 (témoin f.7)

Au terme de cette étude qualitative, nous avons pu isoler 56 stéroïdes, soit :

- 21 stéroïdes en C_{19} (tableaux n° 14 et 15 p. 182 et 183)
- 34 stéroïdes en C_{21} (tableaux n° 16 à 18 p. 184 à 186)
- 1 stéroïde en C_{18}, l'estriol (tableau n° 19 p.187).

Parmi les composés en C_{19} et C_{21}, la structure respectivement de 14 et de 18 stéroïdes a été totalement élucidée.

B. ETUDE QUANTITATIVE

Les résultats en sont donnés dans les tableaux n° 14 à 19 p.182 à 187.

L'étude quantitative étant basée sur la hauteur d'un pic, en chromatographie gazeuse, il a été impossible de quantifier de manière exacte quelques stéroïdes mal séparés (pics correspondant au mélange de plusieurs produits). Ceci explique que les résultats dans ces cas aient été exprimés comme un ordre de grandeur compris entre une valeur minimale et une valeur maximale, en considérant que le stéroïde intéressé peut contribuer au pic considéré pour un pourcentage variant de 1 à 99%.

Pour chaque produit, la valeur donnée, en mg/24h, correspond au total des quantités de ce produit dans les différentes fractions, ce qui explique, dans le cas des mélanges, que la variation soit plus ou moins grande (un même stéroïde étant mélangé dans une fraction, mais s'éluant de façon pure dans une autre fraction).

N°	NOM SYSTEMATIQUE	NOM USUEL	TEMOIN	DECTANCYL	ACTH
2	3β-hydroxy-5β-androstan-17-one	épiétiocholanolone	0,05		
3	3α-hydroxy-5-androsten-17-one	épi-DHEA	0,09		
4	3α-hydroxy-5α-androstan-17-one	androstérone	1,84	0,82	1,26
5	3α-hydroxy-5β-androstan-17-one	étiocholanolone	1,74	0,89	1,46
11	3α,7α-dihydroxy-5α-androstan-17-one	7α-hydroxy-androstérone	0,31 à 0,96 individualisation discutable	0,27	0,73
13	3α,16α-dihydroxy-5-androsten-17-one	16α-hydroxy-épi-DHEA			
14	3ξ,X-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one			0,24	
15	3ξ,X-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one		0,22		
16	3α,16α-dihydroxy-5ξ-androstan-17-one			0,17	
17	3α,7α-dihydroxt-5β-androstan-17-one	7α-hydroxy-étiocholanolone	< 1,30	< 2,47	
*19	3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one	11β-hydroxy-androstérone	7,17à 8,29	1,86 à 4,34	1,67
20	3α,15α-dihydroxy-5α-androstan-17-one	15α-hydroxy-androstérone	0,14		
22	3α,11β-dihydroxy-5β-androstan-17-one	11β-hydroxy-étiocholanolone	0,50	0,10	> 0,70
23	3α,15α-dihydroxy-5β-androstan-17-one	15α-hydroxy-étiocholanolone	2,20		
34	3β,16α-dihydroxy-5-androsten-17-one	16α-hydroxy-DHEA		< 0,09	
*8	3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione	11-oxo-androstérone	0,58	0,17	1,47
*12	3α-hydroxy-5β-androstan-11,17-dione	11-oxo-étiocholanolone	0,40 à 1,52	0,81	0,67

TABLEAU N ° 14

Stéroïdes en C_{19} : 17-oxostéroïdes neutres (quantités excrétées en mg/24h)

N°	NOM SYSTEMATIQUE	TEMOIN	DECTANCYL	ACTH
6	5ξ-androstane-3ξ,11β,17ξ-triol		0,15	
7	4-androstène-3ξ,17ξ-diol	0,04		0,41
28	5ξ-androstane-3ξ,11β,17ξ-triol			0,08
30	5ξ-androstane-3ξ,16ξ,17ξ-triol			0,06

TABLEAU N ° 15

Stéroïdes en C_{19} : androstène-diol et androstane-triols

(quantités excrétées en mg/24h)

N°	NOM SYSTEMATIQUE	TEMOIN	DECTANCYL	ACTH
9	3α-hydroxy-5β-prégnan-20-one	0,54	0,24	0,25
*18	3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one	1,46 à 4,15	4,65	4,41
21	3ξ,11β-dihydroxy-5ξ-prégnan-20-one			0,58
25	3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one		0,36	
29	3α,16α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one		0,21	
27	3ξ,17α-dihydroxy-5ξ-prégnan-20-one			0,50
31	3β,17α-dihydroxy-5α-prégnan-20-one	0,41	0,75	0,06
36	trihydroxy-prégnan-mono-one		0,22	
37	X,Y,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-mono-one	0,45		
38	trihydroxy-prégnan-mono-one		0,14	
44	3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-prégnan-11-one	< 0,22	0,23	
*49	3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one	2,41	1,12	1,25
57	3ξ,17α,20ξ-trihydroxy-5ξ-pregnan-11-one	< 0,71		

TABLEAU N° 16

Stéroïdes en C_{21} : prégnanolone, hydroxy-prégnanolones, trihydroxy-prégnanolones

(quantités excrétées en mg/24h)

N°	NOM SYSTEMATIQUE	TEMOIN	DECTANCYL	ACTH
24	5α-prégnane-3α,20α-diol	0,94		
26	5β-prégnane-3α,20α-diol	1,80	1,65	> 2,36
33	5α-prégnane-3β,20α-diol			< 0,59
39	5α-prégnane-3α,16α,20α-triol		0,22	0,08 à 0,46
41	5ξ-prégnane-3α,17α,20β-triol	< 0,60		
43	5β-prégnane-3α,17α,20α-triol	11,48 à 12,14	6,90	9,30 à 9,60
45	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol	< 0,44		< 0,15
48	5α-prégnane-3β,16α,20α-triol			< 0,15
52	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ-21-triol	0,25		
55	5ξ-prégnane-3ξ,20ξ,21-triol	< 0,72		
56	5β-prégnane-3α,11β,17α,20β,21-pentol (β-cortol)	< 0,71	0,02	0,04

TABLEAU N ° 17

Stéroïdes en C_{21} : prégnane-diols et prégnane-triols,β-cortol

(Quantités excrétées en mg/24h)

N°	NOM SYSTEMATIQUE	témoin	dectancyl	ACTH
10	5-prégnène-3α,20ξ-diol	0,09 à 0,74		
32	5-prégnène-3β,20β-diol	0,06		< 0,59
35	5-prégnène-3β,20α-diol	1,18	< 0,09	0,28
40	5-prégnène-3α,16α,20α-triol	0,34 à 0,94	0,36	0,34 à 0,72
47	5-prégnène-3ξ,16ξ,20ξ-triol			< 0,15
50	5-prégnène-3β,17α,20α-triol			traces
51	5-prégnène-3ξ,17α-20ξ-triol	traces		
53	5-prègnène-3ξ,17α,20ξ-triol	0,47		
54	5-prégnène-3ξ,17α,20ξ-triol	< 0,72		
46	3β,16α-dihydroxy-5-prégnen-20-one			0,05

TABLEAU N ° 18

Stéroïdes en C_{21} : 5-prégnènes

(quantités excrétées en mg/24h)

N°	NOM SYSTEMATIQUE	NOM USUEL	TEMOIN	DECTANCYL	ACTH
42	estratriène-1,3,5(10)-3β,16α,17β-triol	estriol			0,13

TABLEAU N ° 19

Stéroïdes en C_{18} :. estriol (en mg/24h)

C. SYNTHESE DES RESULTATS

Une excellente corrélation existe entre cette étude et les dosages précédemment effectués par colorimétrie et chromatographie gazeuse non précédée d'une séparation en phase liquide : le même profil d'ensemble est retrouvé, quantitativement, les résultats sont voisins, enfin l'absence d'influence sur les excrétions urinaires de la dexaméthasone et de l'ACTH est à nouveau notée.

Les techniques de CGL et CGL-SM ont eu le mérite essentiel d'isoler dans les urines de cette malade :

- d'une part des composés ayant subi une silylation selon un mode jusqu'ici inconnu : c'est l'intérêt biochimique pur de ce travail
- d'autre part des composés qui n'avaient jusqu'ici jamais été décrits dans les urines d'une malade porteuse de tumeur surrénalienne virilisante.

Nous allons envisager ce double aspect de nos résultats.

1° Description de nouvelles formes de silylation de certains stéroïdes

Pour quatre produits, l'étude par spectrométrie de masse a précisé la formation de deux types de dérivés de silylation :

3α,11β-dihydroxy-5α-androstan-17-one (11β-hydroxyandrostérone) = composé n° '19

3α-hydroxy-5α/β-androstan-11,17-dione (11-oxo-androstérone et 11-oxo-étiocholanolone) = composés n° '8 et '12

3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one (prégnanetriol-11-one) = composé n° '49

3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one (17-hydroxy-prégnanolone) = composé n° '18.

Pour ce dernier composé, l'existence de deux dérivés TMS avaient déjà été décrits (43) ; nous les avons retrouvés : la 17-hydroxy-prégnanolone est éluée à une UM moyenne de 26,07 sous forme di-TMSi, et à une UM de 26,88 (Dectancyl f. 5) sous forme énol-TMSi.

Pour les trois autres composés, il s'agit de résultats personnels, qui ont fait l'objet d'une communication (41) :

. La 11β-hydroxyandrostérone (composé n° '19) était connue sous la forme de son dérivé di-TMSi (82). Nous l'avons retrouvée à une UM moyenne de 26,10. Mais nous avons également individualisé, à une UM de 25,75 (témoin f.4 et f.5, Dectancyl f.5) la 11β-hydroxyandrostérone non silylée en 11.

. La 11-oxo-androstérone (composé n° '8) et la 11-oxo-étiocholanolone (composé n° '12) avaient été décrites sous forme de leur dérivé mono-TMSi (34). Cette forme s'élue, dans notre travail, à une UM moyenne de 25,05 pour la 11-oxo-androstéron et de 25,60 pour la 11-oxo-étiocholanolone. Un dérivé énol-TMSi a été mis en évidence pour chacun de ces produits à une UM moyenne de 25,80 pour la 11-oxo-androstérone (Dectancyl f.3, ACTH f.3 et f.4), de 25,85 pour la 11-oxo-étiocholanolone (f.4 des trois échantillons urinaires).

. Enfin, la prégnanetriol-11-one (composé n° '49) était connue sous sa forme non silylée en 17 (33), que nous avons mise en évidence (UM moyenne = 29,70). Nous l'avons également isolée sous sa forme silylée en 17 à une UM de 30,37 (ACTH f. 8 à 11).

L'intérêt de l'étude par spectrométrie de masse est ici évident pour préciser au niveau de chaque pic chromatographique la nature exacte et l'isomérisme du ou des stéroïdes élués, d'autant que les deux formes de silylation d'un même produit, qui s'éluent à des UM différentes, peuvent être retrouvées dans la même fraction : l'étude de la fraction f.5 des urines témoin est très significative à cet égard puisqu'elle comporte les pics

suivants :

à 25,05 : la 11-oxo-androstérone mono-TMSi

à 25,75 : le mélange de trois produits minimum, dont la 11-oxo-androstérone énol-TMSi et la 11β-hydroxy-androstérone non silylée en 11

à 26,08 : la 11β-hydroxy-androstérone di-TMSi.

2° Description de stéroïdes non encore signalés dans les urines de sujets porteurs de tumeurs surrénaliennes virilisantes

Ces stéroïdes sont les suivants :

la 3β-hydroxy-5β-androstan-17-one (n° 2)

la 3α-hydroxy-5-androsten-17-one (n° 3)

les 3α,7α-dihydroxy-5α/β-androstan-17-one (n° 11 et 17)

les 3α,15α-dihydroxy-5α/β-androstan-17-one (n° 20 et 23)

la 3α-hydroxy-5α-androstan-11,17-dione (n° '8)

la 3α,17α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one (n° '18)

les 5α-prégnane-3α/β,20α-diol (n° 24 et 33)

le 5α-prégnane-3β,16α,20α-triol (n° 48)

trois prégnane-3,20,21-triols (n° 45, 52 et 55)

le 5-prégnène-3β,20β-diol (n° 32)

quatre prégnane-3,17,20-triol-11-one (n° 25, 44, '49 et 57)

1'intérêt de la mise en évidence de ces produits est très inégal pour en tirer des arguments de discussion dans le cadre de l'étude biologique des tumeurs surrénaliennes :

- certains composés n'existent qu'à l'état de traces (n° 2, 3, 48) et ont certainement été isolés grâce à la finesse de la méthode, la chromatographie sur Séphadex LH-20 permettant d'obtenir un fractionnement complémentaire de celui apporté par les analyses en phase gazeuse.

- d'autres composés ne sont que des isomères de produits précédemment décrits (n° '18, 24, 32 et 33)

- PAR CONTRE, TOUTE NOTRE ATTENTION EST RETENUE

PAR LA PRESENCE EN QUANTITE NON NEGLIGEABLE
des 7αhydroxy-androstérone et -étiocholanolone
des 15α-hydroxy-androstérone et -étiocholanolone
de la 11-oxo-androstérone
des prégnane-3,20,21-triols
enfin et surtout
des quatres isomères de la prégnanetriol-11-one avec prédominance de la 3α,17α,20α-TRIHYDROXY-5β-PREGNAN-11-ONE.

Nous retiendrons ces dernières données pour les replacer dans le chapitre de discussion consacré à l'étude de la stéroïdogenèse de notre tumeur.

ETUDE IN VITRO DU MECANISME D'ACTION DE L'ACTH DANS L'OBSERVATION PRESENTEE

Ce travail a été effectué par J.P. RIOU et J.M. SAEZ (LYON). Nous les remercions très vivement de nous avoir transmis les résultats concernant notre malade.

Trois aspects ont été essentiellement envisagés :

I. ETUDE SUR CELLULES ISOLEES DE LA STIMULATION DE LA STEROIDOGENESE.

Elle a été évaluée par la mesure de la formation du cortisol.

Une réponse positive, identique à celle des cellules surrénaliennes normales, a été obtenue avec l'$ACTH_{1-24}$

la PGE_1

l'AMPc

le dibutyryl-AMPc.

II. ETUDE SUR DES PREPARATIONS MEMBRANAIRES DE L'ACTIVATION DE L'ADENYL-CYCLASE.

Cette activation par l'ACTH, la PGE_1, le fluorure de sodium et l'EGTA a été obtenue, identique à celle observée au niveau de la surrénale normale.

III. ETUDE DE LA PROTEINE-KINASE

Les résultats en ont été présentés en détail dans la thèse de RIOU (145) : il s'agit de la tumeur n° VIII.

Cette étude n'a pu être complète dans la mesure où la culture des cellules tumorales n'a pas pu être poursuivie au delà du 16e jour.

Ce travail permet de conclure à une anomalie très probable de la liaison R-C indépendante de l'AMPc, probablement d'une anomalie dynamique de la dissociation du complexe R-C.

Bien qu'aucune précision complémentaire ne puisse être donnée, les conclusions suivantes peuvent être tirées de l'étude de notre tumeur :

IL N'Y A PAS D'ANOMALIE DU MECANISME D'ACTION DE L'ACTH SUR LA STEROIDOGENESE, PROBABLEMENT en est-il de même pour l'AMPc.

IL NE S'AGIT PAS D'UN TROUBLE DE LA RECEPTIVITE MEMBRANAIRE NI DE L'ACTIVATION DE L'ADENYL-CYCLASE PAR L'ACTH.

IL EXISTE UNE ANOMALIE DE LA PROTEINE-KINASE INDEPENDANTE DE L'ACTH ET DE L'AMPc.

L'EXISTENCE D'UNE PERTE DE LA SPECIFICITE DE LA RECEPTIVITE MEMBRANAIRE des cellules tumorales NE PEUT ETRE NI AFFIRMEE NI INFIRMEE, puisque l'effet d'autres hormones polypeptidiques sur l'activation de l'adényl-cyclase n'a pas été testé.

DISCUSSION

L'ensemble de cette étude appelle quatre points de discussion :

1° la mise en relation des symptômes cliniques avec le profil biologique

2° l'étude de la stéroïdogenèse tumorale

3° la présentation des hypothèses pathogéniques ayant trait à la genèse du processus tumoral

4° le regroupement d'un faisceau d'arguments en faveur de la nature bénigne ou maligne d'un tel processus.

I. MISE EN RELATION DES SYMPTOMES CLINIQUES AVEC LE PROFIL BIOLOGIQUE

Le problème majeur est d'expliquer, chez cette malade, cet hirsutisme intense sans aménorrhée, associé à une élévation modérée de la testostéronémie, et à l'absence, dans les urines, de dérivés de la testostérone (glycuronide de testostérone, androstanolone, androstane-diol) et de la DHEA (DHEA libre et conjuguée, androstène-diol).

Il est bien connu que le pouvoir androgénique des hormones corticosurrénaliennes est relativement modeste (sécrétion prédominante d'androgènes"faibles", à fonction cétonique en 17) ; les syndromes de virilisation surrénaliens sont essentiellement liés à la conversion périphérique en androgènes "forts", hydroxylés en 17 (testostérone, androstanolone, androstanediol) qui est réalisée au niveau du foie et des tissus cibles.

Ceci soulève l'intervention du métabolisme intermédiaire, mais également de la réceptivité tissulaire périphérique.

En ce qui concerne le mode d'action des androgènes au niveau des tissus cibles, les notions bien classiques donnent à la testostérone un rôle virilisant majeur, après sa transformation intra-cellulaire en androstanolone ou dihydrotestostérone sous l'action d'une 5α-réductase du réticulum endoplasmique (microsomes).

Or la Δ_4-androstène-dione a également un pouvoir virilisant car elle peut entrer dans la cellule cible et y être transformée en testostérone (125) grâce à l'action d'une 17β-deshydrogénase intra-cellulaire dont la présence a été démontrée

au niveau du complexe pilo-sébacé (67). Du fait de ces mécanismes, la Δ_4-androstène-dione, androgène inactif en lui-même, est potentiellement active.

Dans les hyperplasies surrénales congénitales par déficit en 21-hydroxylase, la virilisation serait expliquée par la surproduction de 17α-hydroxyprogestérone. LORIAUX,RUDER et LIPSETT (115) ont en effet trouvé, dans plusieurs cas, des taux plasmatiques de Δ_4-androstène-dione très élevés (6 à 7 fois les taux normaux) ; or la DHEA et l'androstènediol étaient présents en quantité trop peu importante pour expliquer cette élévation. Son origine serait donc une transformation à partir de la 17α-hydroxyprogestérone.

DANS NOTRE OBSERVATION, l'hirsutisme a régressé après ablation de la tumeur, ce qui rend peu vraisemblable une exacerbation de l'activité 5α-réductase au niveau des tissus cibles. Par contre, le blocage de l'activité 21-hydroxylase fournit beaucoup de 17α-hydroxyprogestérone qui pourrait, comme dans les hyperplasies surrénales congénitales, être transformée en Δ_4-androstène-dione.

Certes, notre étude, basée sur l'analyse des métabolites urinaires, et sur les seuls dosages plasmatiques de testostérone et de 17α-hydroxyprogestérone, est peu précise à cet égard. Néanmoins, même après la survenue d'interconversions périphériques, que nous ne pouvons déceler, l'étude quantitative montre que les taux des métabolites urinaires des stéroïdes en C_{19} androgéniques ou potentiellement androgéniques (testostérone, DHEA et Δ_4-androstène-dione), pris dans leur ensemble, sont peu élevés. Non résolu est le problème de la Δ_4-androstène-dione, qui s'élimine sous forme d'androstérone, d'étiocholanolone et aussi de 5α-androstane-3α,17β-diol après consommation périphérique. Dans notre observation, nous n'avons pas trouvé d'androstanediol, et les taux d'androstérone et d'étiocholanolone sont dans les limites de la normale. Par contre, l'élimination telle

quelle de la Δ4-androstène-dione n'est pas explorée, puisque les stéroïdes ne comportant que des fonctions cétone échappent à l'analyse par les techniques de CGL et CGL-SM (19,20).

Ainsi, l'explication de l'hirsutisme par la filiation 17α-hydroxyprogestérone ⟶ Δ_4-androstène-dione ⟶ utilisation cellulaire de cette dernière dans l'optique d'une androgénisation est une hypothèse séduisante, mais reste une pure suggestion.

Reste le problème de la conservation des menstruations. On n'a pas de certitude quant à l'existence ou non d'ovulations. Là encore, nous ne ferons que suggérer deux possibilités :

- insensibilité du tissu ovarien à l'incitation androgénique, c'est-à-dire anomalie de la réceptivité ovarienne ?
- taux de sécrétion de testostérone insuffisamment élevé pour inhiber la libération de FSH et deLH ? Nous ne disposons d'aucun élément d'orientation, le dosage de ces stimulines n'ayant pas été effectué.

II. LA STEROIDOGENESE TUMORALE

Pour rendre plus claire la discussion sur ce point, nous avons regroupé sous forme d'un tableau les taux des stéroïdes urinaires majeurs isolés par l'étude en CGL et CGL-SM, avec la schématisation de leur origine. (tableau p.202)

En ce qui concerne la présence de dérivés hydroxylés en 15α, il faut remarquer que l'existence d'une 15α-hydroxylase n'est pas connue dans la surrénale normale. Toutefois, les taux globaux des stéroïdes sont trop peu importants pour évoquer la mise en route d'une telle activité au niveau du foie, à titre de "mécanisme de secours" pour dégrader une grande quantité de stéroïdes. Cette activité 15α-hydroxylase serait donc apparue au niveau des cellules surrénaliennes tumorales.

BAULIEU (9) ayant mis en évidence la production, par la surrénale humaine normale, de 7-céto-DHEA, on ne peut préciser si l'hydroxylation en 7α de l'androstérone et de l'étiocholanolone est hépatique ou surrénalienne. On peut même discuter, à partir d'une telle constatation, la production de DHEA par la tumeur ; le seul fait un peu surprenant, alors, est l'absence de DHEA et de 5-androstène-diol dans les urines. Il est à remarquer que BRUN n'avait pas isolé de dérivés 7α-hydroxylés de l'androstérone et de l'étiocholanolone, alors même que les urines du corticosurrénalome étudié contenaient 46,80 mg/24h de DHEA pour 111,90 mg/24h de 17-oxo-stéroïdes totaux. Il semble donc plutôt s'agir, dans le cas que nous avons étudié, de l'existence d'une 7α-hydroxylase hépatique que surrénalienne.

En se reportant aux tableaux des résultats globaux (p.182 à 187), on note l'élimination de composés hydroxylés en 16α, qui d'ailleurs n'apparaissent que sous ACTH, en dehors de la présence, dans les urines sous Dectancyl, de traces de 5α-prégnane-3α,16α,20α-triol et de 3α,16α-dihydroxy-5β-prégnan-20-one. Parmi ces produits hydroxylés en 16, le plus important quantita-

tivement est le 5-prégnène-3α,16α,20α-triol, qui est issu de la Δ_5-prégnènolone après intervention d'une hydroxylation en 16α. Là encore, l'existence d'une 16α-hydroxylase surrénalienne et hépatique a été démontrée, et nous ne pouvons trancher quant au siège de cette hydroxylation. Le fait que ces produits hydroxylés en 16α n'apparaissent que sous ACTH est également à noter, quoiqu'on ne puisse établir une relation de cause à effet. Signalons enfin, en accord avec les travaux de FUKUSHIMA, SMULOWITZ et WILLIAMS (57), que nous n'avons pas trouvé de produit 16α-hydroxylé avec une double liaison en 4 ; cette prédominance des composés 16α-hydroxy-Δ_5 n'a pas reçu d'explication.

Les activités enzymatiques les plus intéressantes à étudier restent toutefois la 11β- et la 21-hydroxylases.

L'activité 11β-hydroxylase ne paraît pas diminuée puisque nous n'avons pas mis en évidence de THS dans les urines, corrélativement à une cortisolémie non diminuée et à des éliminations urinaires importantes de 3α,11β-dihydroxy-5α/β-androstan-17-one. L'absence d'augmentation du cortisol et de ses dérivés urinaires sous ACTH ne peut être discutée qu'en tenant compte des modifications de l'activité 21-hydroxylase.

L'activité 21-hydroxylase est diminuée de façon très évidente, comme le prouvent les taux très élevés des produits situés an amont :

17α-hydroxyprogestérone plasmatique

et, dans les urines,

prégnane-triol

11β-hydroxyandrostérone et 11β-hydroxy-étiocholanolone (avec prédominance de la forme 5α)

17α-hydroxy-prégnanolones

5-prégnène-3,17,20-triols

MAIS SURTOUT PRESENCE DE PREGNANETRIOL-11-ONE, produit considéré comme constamment absent dans les corticosurrénalomes, mais

caractéristique des hyperplasies surrénales congénitales par déficit en 21-hydroxylase (47,48,49,120).

Si ce déficit en 21-hydroxylase est certain dans la tumeur étudiée, il est plus difficile d'expliquer les phénomènes observés au cours des tests dynamiques, car l'hyperplasie surrénale congénitale ne peut constituer un élément valable de comparaison, du fait de la stimulation permanente exercée par l'ACTH.

En effet, dans ces cas, l'administration d'ACTH augmente les 17-oxo-stéroides et le prégnane-triol, sans modifier les métabolites du cortisol, dont le taux de départ est normal ou bas.

Ici, les variations de la cortisolémie observées sous ACTH peuvent traduire que la fonction 11β- hydroxylase est au maximum de ses capacités, et que l'ACTH exogène n'augmente pas les produits hydroxylés en 11β

- soit parce qu'il existe un blocage enzymatique en amont, si bien que sous ACTH l'activité 11β-hydroxylase n'est pas davantage alimentée
- soit parce que la tumeur est totalement insensible à une incitation par la stimuline hypophysaire.

QUANT A LA NATURE MEME DU DEFICIT EN 21-HYDROXYLASE, trois possibilités peuvent être envisagées :

1° Il pourrait s'agir d'une simple insuffisance fonctionnelle, secondaire à l'inflation hormonale : hypothèse peu probable puisque globalement la production tumorale des stéroïdes n'est que modérément augmentée (17-oxo-stéroïdes ne dépassant jamais 30 mg/24h) ; en effet, cette hypothèse semble plus vraisemblable dans certains cas de la littérature comportant des taux de 17 OS de plusieurs centaines de mg/24h : ainsi en est-il de l'observation de GUINET et coll. (73) concernant un corticosurrénalome virilisant sans signe d'hypercorticisme métabolique, avec un taux de 17 OS à 210 mg/24 h, un taux de 17 OH à 100 mg/24h (dont 50% de THS) correspondant à une insuffisance enzymatique fonctionnelle en 11β-hydroxylase,

accessoirement en 21-hydroxylase.

2° On peut discuter l'existence d'un déficit enzymatique initial avec augmentation de l'ACTH endogène et constitution secondaire d'une tumeur localisée sécrétante autonome. Une telle filiation est fortement suggérée quoique non prouvée dans l'observation de DLUHY (35), où 9 ans de troubles cliniques avec profil biologique d'hyperplasie ont précédé l'installation de la tumeur. Dans notre observation, on pourrait évoquer un tel processus en raison du début probable des signes de virilisation plusieurs années auparavant, de l'accélération de la maturation osseuse (mais âge osseux en avance d'un an seulement). Si l'ablation de la tumeur a permis la guérison, on ne dispose pas d'un argument évolutif formel puisque la malade n'a pas pu être revue à distance après arrêt complet du traitement cortisonique.

3° L'existence d'une déviation enzymatique intratumorale est également une hypothèse vraisemblable, bien que n'ayant jamais été décrite au cours d'un corticosurrénalome virilisant. Deux publications évoquent un tel mécanisme :

- celle de WEINSTEIN (188) concernant une tumeur productrice de corticostérone, comportant un déficit en 17α-hydroxylase

- celle de WEST (190), présentant un corticosurrénalome féminisant avec déficit en 11β-hydroxylase.

Dans les deux cas, en effet, les déficits enzymatiques respectifs ont été retrouvés in vitro (homogénats de tissu tumoral mis en présence de présurseurs marqués).

ETUDE QUANTITATIVE : STEROIDES PREDOMINANTS

(mg/24h)

	TEMOIN	DECTANCYL	ACTH	
ANDROSTERONE	1,84	0,82	1,26	
ETIOCHOLANOLONE	1,74	0,89	1,46	
7α-HYDROXY-ANDROSTERONE	0,50	0,27	0,73	
7α-HYDROXY-ETIOCHOLANOLONE	1,30	2,47		
11β-HYDROXY-ANDROSTERONE	8,00	3,00	1,67	
11β-HYDROXY-ETIOCHOLANOLONE	0,50	0,10	0,80	
15α-HYDROXY-ANDROSTERONE	0,14			
15α-HYDROXY-ETIOCHOLANOLONE	2,20			
11-OXO-ANDROSTERONE	0,58	0,17	1,47	
11-OXO-ETIOCHOLANOLONE	1,00	0,81	0,67	
5-PREGNENE-DIOLS	1,24		0,80	← 5-prégnènolone
5-PREGNENE-3,17,20-TRIOLS	1,00			← 17α-hydroxy-prégnènolone
PREGNANE-3,17,20-TRIOLS	12,00	6,90	10,00	← 17α-hydroxy-progestérone
17-HYDROXY-PREGNANOLONES	3,50	5,40	4,80	progestérone
PREGNANE-DIOLS	2,74	1,65	1,40	
PREGNANOLONE	0,54	0,24	0,25	
11β-HYDROXY-PREGNANOLONE			0,58	← 11β-hydroxy-progestérone
PREGNANETRIOL-11-ONE	2,80	1,71	1,20	← 21-desoxy-cortisol
PREGNANE-3,20,21-TRIOLS	1,00		0,10	

composés soulignés = ceux décrits pour la première fois dans une tumeur surrénalienne virilisante.

Certaines valeurs indiquées ne sont qu'approximatives (cf. tableaux détaillés de l'étude quantitative)

III. PATHOGENIE DE L'AUTONOMIE TUMORALE

L'absence de réponse in vivo des sécrétions tumorales aux épreuves de stimulation et de freinage est un problème posé de façon très générale par les tumeurs corticosurrénaliennes.

Nous avons donné les résultats de l'exploration à l'échelon cellulaire du mécanisme d'action de l'ACTH dans l'observation présentée. RIOU (145), étudiant dans les mêmes conditions 8 autres tumeurs, a trouvé des résultats divergents en ce qui concerne le site du trouble de la réponse à l'ACTH : dans 3 cas, l'ACTH n'aboutissait à aucune augmentation de l'activité adénylate-cyclase, dans 2 autres cas, le dibutyryl-AMPc était inefficace sur la stéroïdogenèse. La réponse de la cellule tumorale à l'ACTH n'est donc pas univoque.

Ce travail présente, de plus, une tumeur ayant des caractéristiques voisines de la nôtre. Ici, toutefois, il ne semblait pas exister de déficit enzymatique. In vitro, la stéroïdogenèse était stimulée par l'ACTH et par le dibutyryl-AMPc, comme dans notre cas. L'étude détaillée permettait également de conclure à une anomalie de la dissociation des unités R et C de la protéine-kinase, vraisemblablement par phosphorylation anormale de la sous-unité R.

Quoi qu'il en soit, on ne peut en déduire qu'une telle anomalie de la protéine-kinase soit la cause des perturbations de la stéroïdogenèse - nous en avons précédemment donné les raisons.

IV. LA RECHERCHE DE CRITERES DE BENIGNITE

Une tumeur corticosurrénale sécrétante est avant tout évocatrice de malignité (74), et on ne dispose d'aucun critère pour éliminer formellement cette dernière en présence d'un cas apparemment bénin.

NOTRE OBSERVATION SE PRESENTE TOUTEFOIS COMME UNE TUMEUR BENIGNE ; elle est l'occasion de rappeler les principaux critères de discussion :

1° Les formes cliniques à type d'hirsutisme pur ne se distinguent pas sur la plan évolutif : parmi les observations de la littérature, on trouve des cas où la malignité est affirmée (106,139,140) ou très probable (72,75,127), d'autres où aucun critère de malignité n'est retrouvé (63,92).

2° La polyglobulie notée dans le cas que nous présentons aurait pu en imposer pour un élément en faveur de la malignité. En fait, les anomalies hormonales peuvent l'expliquer à elles seules : des cas de polyglobulie ont été décrits au cours d'hyperplasie surrénale congénitale (66) ; l'effet des androgènes, en particulier de la testostérone, serait de stimuler les lignées médullaires, principalement la lignée rouge qu'ils sensibiliseraient à l'action de l'érythropoïétine (166). Or, la 17α-hydroxyprogestérone a un effet similaire (99).

3° Le poids de la tumeur, comme le chiffre des 17 OS seraient d'autant plus alarmants qu'ils sont élevés. Il n'est point besoin de rappeler les nombreuses discordances fournies par la littérature. Là encore, le petit poids de la tumeur (50 g) et le chiffre peu élevé des 17 OS (18 à 30 mg/24h) ne constituent pas un critère formel de bénignité. Il en est de même de l'évolution des sécrétions au cours des tests de stimulation et de freinage, telle tumeur "bénigne" n'étant pas stimulable, telle tumeur maligne l'étant.

4° L'étude en microscopie optique n'a montré aucun des signes en faveur d'un processus malin (74) : pas d'envahissement vasculaire, pas d'effraction capsulaire, pas de mitose fréquente, pas de thrombose veineuse... mais au contraire un grand monomorphisme cellulaire.

L'étude ultrastructurale est superposable aux deux publications de la littérature que nous avons notées (1,50) ; elle permet seulement de conclure que les cellules tumorales ont un caractère endocrine ; elles sécrètent des stéroïdes, vraisemblablement des androgènes : abondance du réticulum endoplasmique lisse, d'inclusions osmiophiles et de mitochondries de type tubulaire.

Ainsi, la tumeur que nous avons étudiée ne présente aucun critère en faveur de la malignité. Nous avons individualisé deux facteurs qui peut-être pourraient renforcer l'impression de bénignité :

- le faible potentiel de multiplication cellulaire, puisque, sur 3 mises en culture, 2 ont échoué, la troisième n'ayant été maintenue que 16 jours.

- l'absence de toute anomalie de la réponse de la cellule à l'ACTH jusqu'à la formation de l'AMPc ; il est à remarquer, dans le travail de RIOU (145), que la deuxième tumeur qui se comporte de façon analogue à la nôtre ne présente elle aussi aucun critère de malignité, alors que les autres sont des carcinomes affirmés.

Ces constatations sont encore en nombre trop limité pour apporter un élément nouveau dans l'étude pronostique des tumeurs surrénaliennes.

CONCLUSIONS

1. Les multiples aspects biologiques des tumeurs surrénaliennes virilisantes ont été envisagés d'une manière aussi complète que possible dans ce travail, où nous faisons le point tout à la fois des données acquises et des hypothèses émises.

2. Nous avons également présenté une observation personnelle très originale en ce qui concerne le profil global des stéroïdes urinaires : celui-ci permet en effet d'affirmer un déficit partiel en 21-hydroxylase, essentiellement en raison des taux élevés de la 3α,17α,20α-trihydroxy-5β-prégnan-11-one, composé jusqu'ici considéré comme constamment absent dans les tumeurs corticosurrénaliennes ; le taux de 17α-hydroxyprogestérone plasmatique est également très augmenté. Par contre, l'excrétion des stéroïdes tumoraux n'est nullement influencée par les tests de stimulation et de freinage. Cette tumeur, dont l'existence a été affirmée radiologiquement et anatomiquement, présente donc une totale autonomie in vivo.

Si le déficit enzymatique est affirmé, sa localisation n'est pas certaine. Probablement est-il lié à des perturbations situées au sein même des cellules tumorales. Nous avons tenté de le relier aux mécanismes intra-cellulaires de régulation de la stéroïdogenèse, qui sont encore mal connus tant dans les cellules surrénaliennes normales que dans les cellules tumorales. Une anomalie de la protéine-kinase a été notée ; elle n'explique en rien l'autonomie tumorale in vivo et le déficit enzymatique. Il n'y a par contre aucune anomalie de la réceptivité membranaire. On ne peut préciser si le caractère spécifique de cette réceptivité est ou non conservé.

La tumeur est vraisemblablement bénigne, notion en faveur de laquelle s'inscrivent avant tout des critères "histofonctionnels" ; l'étude ultrastructurale n'a mis en évidence aucun caractère spécifique.

3. Enfin, cette observation nous a donné l'occasion d'appliquer les techniques de chromatographie gaz-liquide et de

chromatographie gaz-liquide couplée à la spectrométrie de masse à un problème intéressant de biologie humaine. Seules ces méthodes pouvaient permettre l'isolement et la quantification de 56 stéroïdes, conduisant à une meilleure connaissance du spectre de masse de plusieurs composés.

A défaut de répondre à toutes les questions posées, ce travail expose donc les inconnues qui persistent dans le domaine de la physiologie des cellules surrénaliennes normales et tumorales. Il met également en valeur les possibilités offertes par les techniques de cultures cellulaires, utilisées en parallèle avec des méthodes fines d'identification des composés hormonaux.

Le Président de la Thèse :

VU et permis d'imprimer

DIJON, le 30 octobre 1975

Le Doyen,

BIBLIOGRAPHIE

(CETTE BIBLIOGRAPHIE PRESENTE ESCLUSIVEMENT LES REFERENCES CITEES DANS LE TEXTE)

1 - AKHTAR (M.), GOSALBEZ (T.), YOUNG (I.)
Ultrastructural study of androgen producing adrenocortical adenoma.
Cancer 1974,34, 322-327

2 - ALLEN (W.M.), HAYWARD (S.J.), PINTO (A.)
A color test for dehydroisoandrosterone and closely related steroids of use in the diagnosis of adrenocortical tumors.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1950, 10, 54-70

3 - ANLIKER (R.), ROHR (O.), MARTI (M.)
Untersuchungen über Organextrakte ; 25 Mitteilung über den Nachweis von Testosteron in einem virilisierenden Nebennierenrinden Tumor.
Helvet. Chim. Acta 1956, 39, 1100-1106

4 - APERT (M.)
Dystrophies en relation avec des lésions des capsules surrénales. Hirsutisme et progeria.
Bull. Soc. Pediat. Paris 1910, 12, 501-518

5 - ARINGER (L.), ENEROTH (P.), GUSTAFSSON (J.A.)
Trimethylbromosilane catalyzed trimethylsilylation of slowreacting hydroxy- and oxosteroids in gaz chromatographic spectrometric analysis.
Steroids 1971,17, 377-398

6 - BAULIEU (E.E.)
Isolement dans le plasma et dans l'urine d'ester-sulfate de 5-androstène-3βol-17-one chez une malade atteinte de tumeur surrénalienne.
C.R.Acad. Sc. Paris 1959, 248, 1441-1443

7 - BAULIEU (E.E.)
Esters-sulfates de stéroïdes hormonaux. Isolement de l'ester-sulfate de 5-androstène-3βol-17-one (dehydroépiandrostérone) dans une tumeur corticosurrénalienne. Absence de stéroïde libre.
C.R.Acad.Sc. Paris 1960, 251, 1421-1423

8 - BAULIEU (E.E.)
Studies on conjugated 17-ketosteroids in a case of adrenal tumor.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1962, 22, 501-510

9 - BAULIEU (E.E.), EMILIOZZI (R.), CORPECHOT (C.)
Isolement dans le plasma veineux périphérique et surrénalien de l'ester-sulfate de 5-androstène-3βol-7,17-dione.
Experientia 1961, 17, 110-114

10 - BAULIEU (E.E.), MICHAUD (G.), BENHAMOU (R.)
Mise en évidence d'un glycuronide de déhydroépiandrostérone dans les urines d'une malade porteuse d'une tumeur surrénalienne.
C.R.Soc.Biol. 1961, 155, 1003-1006

11 - BAULIEU (E.E.), WALLACE (E.), LIEBERMAN (S.)
The conversion in vitro of Δ_5-androstène-3β,17β-diol-17α-^{3}H to testostérone-17α-^{3}H by human adrenal and placental tissue.
J. Biol. Chem. 1963, 238, 1316-1319

12 - BEALL (R.J.), SAYERS (G.)
Isolated adrenal cells : steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in response to ACTH.
Arch. Bioch. Biophys. 1972, 148, 70-76

13 - BEGUE (R.J.), BRUN (J.M.), DESGRES (J.), PADIEU (P.) avec la collaboration technique de Madeleine MORINIERE et de Nicole PITOIZET
Stéroïdes urinaires dans un corticosurrénalome virilisant.
J. Steroid Biochem. 1976, 7, 583-591

14 - BEGUE (R.J.), DESGRES (J.), GUSTAFSSON (J.A.), PADIEU (P.)
Method of analysis of urinary steroids of human pregnancy by GLC and GC-MS of Sephadex LH-20 chromatographic fractions.
J. Chromatogr. Sci. 1974, 12, 763-769

15 - BEGUE (R.J.), DESGRES (J.), GUSTAFSSON (J.A.), PADIEU (P.)
Analyse modulaire des stéroïdes urinaires pendant la gestation humaine.
J. Steroid Biochem. 1976, 7, 211-221

16 - BJÖRKHEM (I.), GUSTAFSSON (J.A.), GUSTAFSSON (S.A.)
Metabolism of steroids in germfree and conventional rats treated with a 3β-hydroxy-Δ_5-steroid oxidoreductase inhibitor.
Eur. J. Biochem. 1970, 16, 557-566

17 - BLOCH (E.), DORFMAN (R.I.), PINCUS (G.)
The conversion of acetate to C 19 steroids by human adrenal gland slices.
J. Biol. Chem. 1957, 224, 737-750

18 - BOYD (G.S.), TRZECIAK (W.H.)
Cholesterol metabolism in the adrenal cortex : studies on the mode of action of ACTH.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 1974, 188, 361-377

19 - BRUN (J.M.)
Chromatographie gaz-liquide et chromatographie gaz-liquide - spectrométrie de masse de stéroïdes urinaires en biologie humaine.
Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Dijon, 1975

20 - BRUN (J.M.)
Etude de l'excrétion stéroïdienne urinaire d'un corticosurrénalome virilisant. Analyse qualitative et quantitative par chromatographie liquide-gaz et chromatographie liquide-gaz couplée à la spectrométrie de masse.
Mémoire du Certificat d'Etudes d'Endocrinologie et des Maladies de la Nutrition, Faculté de Médecine de Lyon, 1975

21 - BRUNSCHWIG (H.)
Liber de arte distillendi, 1512

22 - BUONASSISI (V.), SATO (G.), COHEN (A.I.)
Hormone producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin.
Proc. Nat. Acad. Sci. 1962, 48, 1184-1190

23 - BUTLER (G.C.), MARRIAM (G.F.)
The isolation of pregnane-3,17,20-triol from the urine of women showing the adreno-genital syndrome.
J. Biol. Chem. 1937, 119, 565-572

24 - BUTLER (G.C.), MARRIAN (G.F.)
Chemical studies on the adreno-genital syndrom. I. The isolation of 3(α)-hydroxy-etiocholane-17-one, 3(β)-hydroxy-etioallocholane-17-one (isoandrosterone) and a new triol from the urine of a woman with an adrenal tumor.
J. Biol. Chem. 1938, 124, 237-247

25 - CALLOW (R.K.)
The significance of the excretion of sex hormones in the urine.
Proc. Roy. Soc. Med. 1936, 31, 841-855

26 - CHAMBAZ (E.M.), HORNING(E.C.)
Conversion of steroids in trimethylsilyl derivatives for gas-phase analysis.
Anal. Biochem. 1969, 30, 7-24

27 - CHIMENES (H.), MASSIN (J.P.), KLOTZ (H.P.), COURNOT (L.), HEPP (J.), SORS (Ch.)
Un cas de virilisme pilaire pur par tumeur surrénale chez la femme.
Sem. Hôp. Paris 1962, 38, 3193-3198

28 - COHEN (D) THOMAS (R.G.)
Adrenal virilizing tumors and pregnancy.
S. Afr. Med. J. 1960, 34, 46-49

29 - COHN (G.L.), MULROW (P.J.), DUNNE (V.C.)
In vitro synthesis of dehydroepiandrosterone sulfate by an adrenal adenoma.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1963, 23, 671-676

30 - DARCY (H.P.G.)
Les fontaines publiques de la Ville de DIJON.
Victor Dalmont, Paris, 1856

31 - DAZORD (A.), MORERA (A.M.), BERTRAND (J.), SAEZ (J.M.)
Prostaglandin receptors in human and ovine adrenal glands : binding and stimulation of adenyl-cyclase in subcellular preparations.
Endocrinology 1974, 95, 352-359

32 - DECOURT (J.), MICHARD (J.P.), WEINMANN (S.H.), LOUCHART (J.), BAULIEU (E.E.)
Tumeur virilisante de la surrénale.
Ann. Endocr. 1959, 20, 337-345

33 - DESGRES (J.), BEGUE (R.J.), CURIE (G.), NIVELON (J.L.), PADIEU (P.)
Identification and quantitative assay of steroids in congenital cortico-adrenal hyperplasia in newborn infants by gas-liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.
In : Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine,
A. Frigerio et N. Castagnoli Eds, Raven Press, New York, 1974,p.349-359

34 - DESGRES (J.), BEGUE (R.J.), PADIEU (P.)
Analyse qualitative et quantitative des 17-oxostéroïdes et des 20-hydroxy-21-désoxy-stéroïdes urinaires par chromatographie gaz-liquide et par spectrométrie de masse.
Clin. Chim. Acta 1974, 52, 381-405

35 - DLUHY (R.G.), BARLOW (J.J.), MAHONEY (E.M.), SHIRLEY (R.L.), WILLIAMS (G.H.)
Profile and possible origin of an adrenocortical carcinoma.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1971, 33, 312-317

36 - DOHAN (F.C.), ROSE (E.), EIMAN (J.W.), RICHARDSON (E.M.), ZINTEL (H.)
Increased urinary estrogen excretion associated with adrenal tumors : report of four cases.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1953, 13, 415-428

37 - DOMINGUEZ (O.V.), HUSEBY (R.A.)
In vivo and in vitro studies of steroid production by a luteoma and an adrenal cortical carcinoma in mice.
Endocrinology 1969, 84, 1039-1047

38 - DOOUSS (T.W.), SKINNER (S.J.M.), COUCH (R.A.F.)
Synthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate by the human adrenal.
J. Endocrinol. 1975, 66, 1-12

39 - DORFMAN (R.I.)
Androgen biosynthesis in adrenal tumors.
Conference of the human adrenal cortex, Glasgow, Juillet 1960

40 - DORFMAN (R.I.), SHIPPLEY (R.A.)
The androgens.
J. Wiley, New York, 1956

41 - DUBOST (M.), BEGUE (R.J.), PADIEU (P.)
Stéroïdes urinaires dans un corticosurrénalome virilisant.
Communication aux Journées du G.A.M.S. (Applications de la Chromatographie et de la Spectroscopie en Biochimie et Nutrition)
Semaine Scientifique Internationale de Tours, Septembre 1976

42 - ERIKSSON (H.), GUSTAFSSON (J.A.)
Steroids in germfree and conventional rats. Steroids in the mono- and di-sulphate fractions of faeces from female rats.
Eur. J. Biochem. 1970, 16, 252-260

43 - ERIKSSON (H.), GUSTAFSSON (J.A.), SJÖVALL (J.)
Steroids in germfree and conventional rats. 4. Identification and bacterial formation of 17α-pregnane derivatives.
Eur. J. Biochem. 1968, 6, 219-226

44 - FANTL (V.)
Isolation of urinary 3α,16α-dihydroxy-androst-5-en-17-one in adrenal carcinoma.
J. Endocrinol. 1973, 56, 615-616

45 - FARESE (R.V.), LINARELLI (L.G.), GLINSMANN (W.H.), DITZION (B.R.), PAUL (M.I.), PAUK (G.L.)
Persistence of the steroidogenic effect of adenosine 3'5' monophosphate in vitro : evidence for a third factor during the steroidogenic effect of ACTH.
Endocrinology 1969, 85, 867-874

46 - FINKELSTEIN (M.), FORCHIELLI (C.), DORFMAN (R.I.)
Estimation of testosterone in human plasma.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1961, 21, 98-101

47 - FINKELSTEIN (M.), GOLDBERG (S.)
A test for qualitative and quantitative estimation of pregnane 3α,17α, 20α-triol-11-one in urine and its significance in adrenal disturbances.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1957, 17, 1063-1070

48 - FINKELSTEIN (M.), SCHOENBERGER (J.)
Urinary steroids in 10 cases of adrenal carcinoma, with special reference to pregnane-3α,17α,20α-triol-11-one.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1959, 19, 608-612

49 - FINKELSTEIN (M.), VON EUW (J.), REICHSTEIN (T.)
Isolierung von 3α,17 ,20α-trioxy-pregnanon-(11) aus pathologischem menschlichen Harn.
Helvet. chim. acta 1953, 36, 1266-1277

50 - FISHER (E.R.), DANOWSKI (T.S.).
Ultrastructural study of virilizing adrenocortical adenoma.
Am. J. Clin. Pathol. 1973, 59, 480-489

51 - FRIESEN (H.), TOLIS (G.), SHIN (R.), WANG (P.H.), HARDY (J.)
Studies on human prolactin : chemistry radioreceptor assay and clinical significance .
International Symposium on Human Prolactin, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, p.11-23

52 -FUHRMAN (S.A.), GILL (G.N.)
Hormonal control of adrenal RNA polymerase activities.
Endocrinology 1974, 94, 691-700

53 - FUKUSHIMA (D.K.), BRADŁOW (H.L.), HELLMAN (L.), GALLAGHER (T.F.)
Origin of pregnanetriol in a patient with adrenal carcinoma.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1962, 22, 765-772

54 - FUKUSHIMA (D.K.), BRADLOW (H.L.), HELLMAN (L.), GALLAGHER (T.F.)
Further studies on the origin of pregnanetriol in adrenal carcinoma.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1963, 23, 266-273

55 - FUKUSHIMA (D.K.), GALLAGHER (T.F.)
Steroid production in "non functioning" adrenal cortical tumor.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1963, 23, 923-927

56 - FUKUSHIMA (D.K.), KEMP (A.D.), SCHNEIDER (R.), STOKEM (M.B.), GALLAGHER (T.F.)
Studies in steroid metabolism. XXV. Isolation and characterization of new urinary steroids.
J. Biol. Chem. 1954, 210, 129-137

57 -FUKUSHIMA (D.K.), SMULOWITZ (M.), WILLIAMS (K.I.H.)
Δ5-pregnene-3α,16α,20α-triol and related steroids in adrenocortical carcinoma.
J. Biol. Chem. 1961, 236, 3147-3150

58 - FUTTERWEIT (W.), MAC NIVEN (N.L.), GUERRA-GARCIA (R.), GIBREE (N.), DROSDOWSKY (M.), SIEGEL (G.L.), SOFFER (L.J.), ROSENTHAL (L.R.), DORFMAN (R.I.)
Testosterone in human urine.
Steroids 1964, 4, 137-145

59 - GALLAIS (A.)
Le syndrome génito-surrénal (étude anatomo-clinique).
Thèse Paris 1911

60 - GARREN (L.D.), GILL (G.N.), MASUI (H.), WALTON (G.M.)
On the mechanism of action of ACTH.
Rec. Prog. Hormone Res. 1971, 27, 433-478

61 - GARRIGUES (J.C.), JULIEN (H.), ROUX (R.), VALETTE (A.)
Tumeur cortico-surrénale virilisante de l'adulte. II. Etude biochimique.
Ann. Endocrinol. 1965, 26, 566-571

62 - GEBAUER (A.), LINKE (A.)
Virilismen der nebennieren-rinden tumoren (adreno-genitales syndrom).
Deutsch. Med. Wschr. 1951, 76, 456-462

63 - GILBERT-DREYFUS, REBOUL (H.), ZARA (M.)
Syndrome androgénique pur chez une jeune fille. Localisation par l'aortographie d'une tumeur surrénale droite. Epinephrectomie.
Bull. Mém. Soc. Med. Hôp. Paris 1950, 66, 695-698

64 - GILL (G.N.), GARREN (L.D.)
On the mechanism of action of ACTH. The binding of cAMP to on adrenal cortical protein.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1969, 63, 512-519

65 - GIVENS (J.R.), ANDERSEN (R.N.), WISER (W.L.), COLEMAN (S.A.), FISH (S.A.)
A gonadotropin-responsive adrenocortical adenoma.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1974, 38, 126-133

66 - GOLD (A.P., MICHAEL (A.F.)
Congenital adrenal hyperplasia associated with polycythemia.
Pediatrics 1959, 23, 727-730

67 - GOMEZ (E.C.), HSIA (S.L.)
In vitro metabolism of testosterone 4-^{14}C and Δ4 androstene-3,17-dione 4-^{14}C in human skin.
Biochemistry 1968, 7, 24-36

68 - GRAHAME-SMITH (D.G.), BUTCHER (R.W.), NEY (R.L.), SUTHERLAND (E.W.)
Adenosine-3',5'-monophosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotropic hormone on the adrenal cortex.
J. Biol. Chem. 1967, 242, 5535-5541

69 - GREENBLATT (R.B.), ROY (S.)
Virilizing adrenal tumors.
In Greenblatt (R.B.) : The hirsute female
C.C. Thomas Ed. Springfield 1963, ch. 8, p.109-148

70 - GUINET (P.)
Les tumeurs masculinisantes de la surrénale chez la femme.
In "Actualités Endocrinologiques", Gonades et Glandes surrénales,
12° série, 1971, 1'Expansion Ed. Paris, p.41-58

71 - GUINET (P.), BETHOUX (R.), REVOL (A.), PERRIN (J.), PUTELAT (R.),
FREDERICH (A.)
Un cas de corticosurrénalome avec virilisme. Etude biochimique des stéroïdes
urinaires et tumoraux.
Ann. Endocrinol. 1958, 19, 398-407

72 - GUINET (P.), REVOL (A.), BETHOUX (R.), ANJOU (A.), MONCHAMP (A.)
Un cas de corticosurrénalome à forme d'hirsutisme pur. Etude des stéroïdes
urinaires, sanguins et tumoraux.
Soc. Med. Hôp. Paris 1960, 76, 1067-1077

73 - GUINET (P.), MORNEX (R.), REVOL (A.), TOURNIAIRE (J.), GALLOIS (R.)
Une observation de corticosurrénalome virilisant. Métabolites urinaires,
test à la métopirone, produits de sécrétion tumorale.
Ann. Endocrinol. 1965, 26, 554-558

74 - GUINET (P.), PUTELAT (R.), BRET (P.), BETHOUX (R.), REVOL (A.)
Les tumeurs corticosurrénales virilisantes chez la femme.
Rev. Lyon. Méd. 1959, 8, 97-112

75 - GUINET (P.), REVOL (A.), MALLEIN (R.), BETHOUX (R.), ANJOU (A.), MONCHAMP(A
Considérations sur un cas de corticosurrénalome à forme d'hirsutisme pur.
Rev. Lyon. Méd. 1961, 10, 245-264

76 - GUINET (P.), REVOL (A.), TOURNIAIRE (J.)
Les tumeurs androgéniques de la surrénale.
Rapport présenté au XXXV° Congrès Français de Médecine, Paris 1965,
Masson Ed. Paris, 1965, P.41-98

77 - GUINET (P.), REVOL (A.), TOURNIAIRE (J.)
Les tumeurs androgéniques de la surrénale.
Rev. Lyon. Méd. 1966, 15, 275-322

78 - GUSTAFSSON (J.A.)
Steroids in germfree and conventional rats. Steroid monosulphates in urine from female rats.
Eur. J. Biochem. 1970, 14, 560-566

79 - GUSTAFSSON (J.A.)
Steroids in urine from a patient with adrenocortical carcinoma after treatment with op'DDD.
Steroidologia 1971, 2, 27-37

80 - GUSTAFSSON (J.A.), LISBOA (B.P.)
Studies on the metabolism of C_{19} steroids in rat liver. Biosynthesis of saturated 17-oxo-$C_{19}O_3$steroids in rat liver microsomes.
Eur. J. Biochem. 1970, 16, 475-480

81 - GUSTAFSSON (J.A.), SCHAKLETON (C.H.L.), SJÖVALL (J.)
Steroids in newborns and infants. C_{19} and C_{21} steroids in faeces from infants.
Eur. J. Biochem. 1969, 10, 302-311

82 - GUSTAFSSON (J.A.), SJÖVALL (J.)
Steroids in germfree and conventional rats. 5. Identification of C_{19} steroids in faeces from germfree rats.
Eur. J. Biochem. 1968, 6, 227-235

83 - HAMWI (G.J.), SERBIN (R.A.), KRUGER (F.A.)
Does adrenocortical hyperplasia result in adrenocortical carcinoma ?
N. Engl. J. Med. 1957, 257, 1153-1157

84 - HARA (J.)
Direct analysis of corticosteroids as trimethylsilyl ethers by gas-phase chromatography.
Chem. Pharmacol. Bull. 1966, 14, 1311-1314

85 - HIRSCHMANN (H.)
Steroid excretion in a case of adrenocortical carcinoma. I. The isolation of a Δ5-androstenetriol-3β,16,17.
J. Biol. Chem. 1943, 150, 363-379

86 - HIRSCHMANN (H.), HIRSCHMANN (F.B.)
Steroid excretion in a case of adrenocortical carcinoma. II. An examination of the non-ketonic fraction precipitable with digitonin.
J. Biol. Chem. 1945, 157, 601-612

87 - HIRSCHMANN (H.), HIRSCHMANN (F.B.)
Steroid excretion in a case of adrenocortical carcinoma. III. The isolation of Δ5-pregnenediol-3β, 17β-one-20 and of 17α-méthyl-Δ5-D-homoandrostenediol-3β,17α,one-17.
J. Biol. Chem. 1947, 167, 7-25

88 - HIRSCHMANN (H.), HIRSCHMANN (F.B.)
Steroid excretion in a case of adrenocortical carcinoma. IV. Δ5-pregnetriol-3β,16α,20α.
J. Biol. Chem. 1950, 184, 259-282

89 - HIRSCHMANN (H.), HIRSCHMANN(F.B.)
Steroid excretion in a case of adrenocortical carcinoma. V. Δ5-pregnenetriol-3β,17α,20α.
J. Biol. Chem. 1950, 187, 137-146

90 - HORNING (E.C.), IKEKAWA (N.), CHAMBAZ (E.M.), JAAKONMAKI (P.I.), BROOKS (C.J.W.)
Studies of analytical separation of human steroids and steroid glucuronides
J. Gas Chromatogr. 1967, 5, 283-292

91 - HUDSON (R.W.), KILLINGER (D.W.)
The in vitro biosynthesis of 11β-hydroxyandrostenedione by human adrenal homogenates.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1972, 34, 215-224

92 - JAILER (J.W.), GOLD (J.J.), CAHILL (G.F.)
Hirsutism as the only clinical manifestation of an adrenal tumor.
Amer. J. Obst. Gynaec. 1954, 67, 201-205

93 - JAILER (J.W.), LOUCHART (J.), CAHILL (G.F.)
Adrenal Virilism. I. Diagnostic considerations and treatment.
J.A.M.A. 1952, 150, 575-579

94 - JAMES (A.T.), MARTIN (A.J.P.)
Gas-liquid partition chromatography. A technique for the analysis of volatile materials.
Analyst. 1952, 77, 915-931

95 - JAMES (A.T.), MARTIN (A.J.P.)
Gas-liquid partition chromatography : the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid.
Biochem. J. 1952, 50, 679-690

96 - JÄNNE (O.)
Identification and quantitation of C_{19} and C_{21} steroids triol sulphates in adult human urine.
J. Steroid Biochem. 1971, 2, 33-41

97 - JÄNNE (O.), LUUKKAINEN (T.), VIHKO (R.)
Solvolyzable steroid conjugates in human plasma after metopirone administration.

98 - JARRIGE (P.), HENRY (R.)
Etude de l'activité glucuronidasique du suc digestif d'Hélix pomatia (L.) et de sa phénol-sulfatase.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1952, 34, 872-885

99 - JEPSON (J.H.), LOWENSTEIN (L.)
Inhibition of the stem cell action of erythropoietin by estradiol valerate and the protective effect of 17α-hydroxyprogesterone caproate and testosterone propionate.
Endocrinology 1967, 80, 430-434

100 - JONES, SCOTT
Hermaphroditism genital anomalies.
Williams et Wilkins eds, 1958

101 - KAHRI (A.)
Histochemical and electron microscopic studies on the cells of the rat adrenal cortex in tissue culture.
Acta endocrinol. 1966, 52, suppl. 108, 1-96

102 - KASE (N.), KOWAL (J.), PERLOFF (W.), SOFFER (L.J.)
In vitro production of androgens by a virilizing adrenal adenoma and associated polycystic ovaries.
Acta endocrinol. 1963, 44, 15-19

103 - KELLER (M.), HAUSER (A.), WALSER (A.)
Virilizing adrenal adenoma associated with increased urinary excretion of estrogens and 17-ketosteroids. Isolation of steroids from the tumor.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1958, 18, 1384-1398

104 - KENNY (F.M.), HOSHIDA (Y.), SIEBER (W.H.), FETTERMAN (H.)
Virilizing tumors of the adrenal cortex.
Amer. J. Dis. Child. 1968, 115, 445-458

105 - KIMMEL (G.L.), PERON (F.G.), HAKSAR (A.), BEDIGIAN (E.), ROBIDOUX (W.F.) LIN (M.T.)
Ultrastructure, steroidogenic potential and energy metabolism of the Snell-adrenocortical carcinoma 494.
J. Cell. Biol. 1974, 62, 152-163

106 - KINSELL (L.N.), LISSER (H.)
Adrenal cortical tumor causing hirsutism without other evidence of virilization.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1952, 12, 50-55

107 - KOWAL (J.)
Adrenal cells in tissue culture. III. Effect of adrenocorticotropin and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on 11β-hydroxylase and other steroidogenic enzymes.
Biochemistry 1969, 5, 1821-1831

108 - KOWAL (J.)
ACTH and metabolism of cultured adrenal cells.
Rec. Prog. Hormone Res. 1970, 26, 623-687

109 - KUO (J.F.), GREENGARD (P.)
Cyclic nucleotide dependent protein kinase. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1969, 64, 1349-1355

110 - LEICHTER (S.B.), JACOBS (L.S.)
Normal gestation and diminished androgen responsiveness in an untreated patient with 21-hydroxylase deficiency.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1976, 42, 575-582

111 - LIEBERMAN (S.), DOBRINER (K.)
The isolation of pregnanediol-3α, 17-one-20 from human urine.
J. Biol. Chem. 1945, 161, 269-278

112 - LIEBERMAN (S.), DOBRINER (K.), HILL (B.R.), FIESER (L.F.), RHOADS (C.P.)
Studies in steroid metabolism. II. Identification and characterization of ketosteroids isolated from urine of healthy and diseased persons.
J. Biol. Chem. 1948, 172, 263-295

113 - LISBOA (B.P.), GUSTAFSSON (J.A.)
Studies on the metabolism of steroids in the foetus. Biosynthesis of 3-hydroxy-Δ4-C_{19} steroids in the human foetal liver.
Eur. J. Biochem. 1970, 14, 556-559

114 - LISBOA (B.P.), STRASSNER (M.), NOCKE-FINCK (L.), BREUER (N.), BAYER (J.M.)
Metabolism of steroid hormones in a virilizing adenoma of adrenal cortex.
Acta Endocrinol. 1975, 80, suppl. 199, 395-395

115 - LORIAUX (D.L.), RUDER (H.J.), LIPSETT (M.B.)
Plasma steroids in congenital adrenal hyperplasia.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1974, 39, 627-630

116 -LUUKKAINEN(T.), ADLERCREUTZ (H.)
Mass spectrometric studies in the specificity of estriol determination in urine by gas-liquid chromatography.
Ann. Med. exp. Fenn. 1967, 45, 264-268

117 -LUUKKAINEN (T.), VANDENHEUVEL (W.J.A.), HAAHTI (E.O.A.), HORNING (E.C.)
Steroids trimethyl ethers properties.
Biochim. biophys. Acta 1961, 52, 599-601

118 - MAHESH (V.B.), GREENBLATT (R.B.)
Hormonal studies in females with virilizing adrenal tumors.
Research on Steroids, vol. III, North Holland Published C° Amsterdam, 1968, p.220-232

119 - MAHOUDEAU (J.A.), BRICAIRE (H.)
Données récentes sur les androgènes plasmatiques.
Rev. Prat. 1973, 23, 881-889

120 - MAIRE (J.)
Etude par chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes urinaires dans huit cas d'hyperplasie surrénale congénitale.
Thèse Médecine, Université de Dijon, 1974 n° 6

121 - MARTIN (A.J.P.), SYNGE (R.L.M.)
A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application of the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins.
Biochem. J. 1941, 35, 1358-1368

122 - MASON (H.L.), KEPLER (E.J.)
Isolation of steroids from the urine of patients with adrenal cortical tumors and adrenal cortical hyperplasia : a new 17-ketosteroid, androstane-3(α),11-diol-17-one.
J. Biol. Chem. 1945, 161, 235-257

123 - MASON (H.L.), SCHNEIDER (J.J.)
Isolation of Δ16-androsten-3(α)-ol from the urine of women with adrenal cortical tumors.
J. Biol. Chem. 1950, 184, 593-598

124 - MAUME (B.F.) , PROST (M.), PADIEU (P.)
Steroid hormone biosynthesis in adrenal cell cultures from newborn rats.
Advances in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, vol.I,
A; Frigerio et N. Castagnoli, Eds, Spectrum Publications, New York,
1976 p.525-540

125 - MAUVAIS-JARVIS (P.)
Les androgènes en physiologie et en pathologie : applications thérapeutiques
Cah. Méd. Lyon. 1975, 51, 733-744

126 - MILNER (A.J.), VILLEE (D.B.)
Steroidogenic and morphologic effects of ACTH on human fetal adrenal cells
grown in tissue culture.
Endocrinology 1970, 87, 596-601

127 - MONCHAMP (A.)
Les corticosurrénalomes avec hirsutisme isolé (à propos d'une observa-
tion personnelle).
Thèse Médecine LYON, 1960 n° 212.

128 - MOYLE (W.R.), KONG(I.C.), RAMACHADRAN (J.)
Steroidogenesis and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation
in rat adrenal cells. Divergent effects of ACTH and its o-nitrophenyl
sulfenyl derivative.
J. Biol. Chem. 1973, 248, 2409-2417

129 - NEY (R.L.), HOCHELLA (N.J.), GRAHAME-SMITH (D.G.), DEXTER (R.N.)
BUTCHER (R.W.)
Abnormal regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and corticosterone
formation in an adrenocortical carcinoma.
J. Clin. Invest. 1969, 48, 1733-1739

130 - NISHIDA (S.), JUNGMANN (R.A.), SCHEPPE (J.S.)
Biosynthesis of steroids from cholesterol ^{14}C by human adrenal carcinoma tissue.
Steroids 1973, 22, 337-350

131 - NYSTROM (E.), SJÖVALL (J.)
Recycling and capillary column chromatography of steroid on lipophilic sephadex.
Archiv för Kemi. 1968, 29, 107-115

132 - O'HARE (M.J.), NEVILLE (A.M.)
Morphological responses to corticotrophin and cyclic AMP by adult rat adrenocortical cells in monolayer culture.
J. Endocrinol. 1973, 56, 529-536

133 - O'HARE (M.J.), NEVILLE (A.M.)
Steroid metabolism by adult rat adrenocortical cells in monolayer culture.
J. Endocrinol. 1973, 58, 447-462

134 - OKADA (M.), FUKUSHIMA (D.K.), GALLAGHER (T.F.)
Isolation and characterization of 3β-hydroxy-Δ5 steroids in adrenal carcinoma.
J. Biol. Chem. 1959, 234, 1688-1692

135 - PEARLMUTTER (A.F.), FRANCO-SAENZ (R.), RAPINO (E.), SAFFRAN(M.)
Human adrenal tissue in vitro : steroidogenic properties.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1974, 39, 150-153

136 - PIERSON (R.W.)
Metabolism of steroid hormones in adrenal cortex tumor cultures
Endocrinology 1967, 81, 693-707

137 - PITTAWAY (D.E.), ANDERSEN (R.N.), GIVENS (J.R.)
In vitro studies on an HCG responsive, testosterone secreting adrenal cortical adenoma.
Steroids 1973, 22, 731-745

138 - PLANTIN (L.O.), DICZFALUSY (E.), BIRKE (G.)
Isolation of dehydroepiandrosterone from an adrenal cortical tumor.
Nature 1957, 179/180, 421-422

139 - PRUNTY (F.T.G.)
J. Clin. Path. 1950, 3, 87
cité dans (140)

140 - PRUNTY (F.T.G.), BROOKS (R.V.), MATTINGLY (D.)
Development of hirsutism after puberty.
Brit. Med. J. 1958, 4, 1554-1557

141 - PUIG (R.)
Corticosurrénalome malin avec métastases multiples et fièvre ondulante.
Bull. Soc. Med. Hôp. Paris 1937, 53, 194-197

142 - RAMACHADRAN (J.), KONG (Y.C.), LILES (S.)
Effects of ACTH and its O-nitrophenyl sulphenyl derivatives on adrenocortical function in vivo.
Acta endocrinol. 1976, 82, 587-599

143 - RAMSEYER (J.), ZALA (A.P.), LEVY (R.P.), LINTON (D.S.), HIRSCHMANN(H.)
Secretion of 16α-hydroxyprogesterone and other steroids by the adult human adrenal.
J; clin. Endocrinol. Metab. 1974, 39, 102-107

144 - REIFENSTEIN (E.C.)
The relation of the adrenal cortex to gynecology.
in : Progress in gynecology, Meigs J.V. and Sturgis S.H. Eds, 1950, vol. II, Grune et Stratton, New York, p. 224

145 - RIOU (J.P.)
Protéine-kinase et mécanisme d'action de l'ACTH dans les tumeurs surrénaliennes humaines.
Thèse Médecine Lyon (Université Claude Bernard) 1975, n° 311

145 bis - ROBINSON (A.M.), DIMOLINE (A.), JONES (D.G.)
Consideration of some types of adrenal tumours.
Ciba Foundation colloquia Endocrinology 1958, 12, 137-152

146 - ROOS (B.A.)
Acth and c-AMP stimulation of adrenal ribosomial protein phosphorylation.
Endocrinology 1973 , 93, 1287-1293

147 - ROOS (B.A.)
Effect of ACTH and c-AMP on human adrenocortical growth and function in vitro.
Endocrinology 1974, 94, 685-690

148 - ROUX-BERGER (J.L.), NAULLEAU (J.), CONTIADES (X.J.)
Corticosurrénalome malin. Aortographie. Exérèse. Guérison opératoire.
Bull. Soc. Nat. Chir. 1934, 791-802

149 - ROVERSI (G.D.), POLVANI(F.), BOMPIANI (A.), NEHER (R.)
Steroid biosynthesis in vitro by a virilizing suprarenal tumor.
Acta endocrinol. 1969, 44, 1-7

150 - RYHAGE (R.)
Use of a mass spectrometer as a detector and analyser for effluents emerging from high temperature gas liquid chromatography columns.
Anal. Chem. 1964, 36, 759-765

151 - RYHAGE (R.), SJÖVALL (J.)
Direct mass spectrometry of steroids in gas-chromatography effluents.
Biochem. J. 1964, 92, 20-26

152 - SAEZ (J.M.), DAZORD (A.), GALLET (D.)
Acth and prostaglandin receptors in human adrenocortical tumors. Apparent modification of a specific component of the ACTH-binding site.
J. Clin. Invest. 1975, 56, 536-547

153 - SAEZ (J.M.) DAZORD (A.), GALLET (D.), BERTRAND (J.)
Liaison de l'insuline à des fractions membranaires de corticosurrénale.
C.R. Acad. Sci. Paris 1973, Série D, 276, 2039-2042

154 - SAEZ (J.M.), LORAS (B.), BERTRAND (J.)
Etude des androgènes in vivo dans un cas de tumeur virilisante de la surrénale.
Ann. Endocrinol. Paris, 1969, 30, 679-681

155 - SAEZ (J.M.), LORAS (B.), MORERA (A.M.), BERTRAND (J.)
Plasma and tumor content of steroids and steroid sulfates in two cases of adrenocortical virilizing carcinoma.
J. Steroid Biochem. 1970, 1, 355-367

156 - SAEZ (J.M.), LORAS (B.), MORERA (A.M.), BERTRAND (J.)
Studies on androgens and their precursors in adrenocortical virilizing carcinoma.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1971, 32, 462-469

157 - SAEZ (J.M.), MORERA (A.M.), DAZORD (A.), BATAILLE (P.)
Interactions of ACTH with its adrenal receptors : specific binding of $ACTH_{1-24}$, its o-nitrophenyl sulfenyl derivative and $ACTH_{11-24}$.
J. Steroid Biochem. 1974, 5, 925-933

158 - SAEZ (J.M.), RIVAROLA (M.A.), MIGEON (C.)
Studies of androgens in patients with adreno-cortical tumors.
J; clin. Endocrinol. Metab. 1967, 27, 615-623

159 - SARUTA (T.), KAPLAN (N.M.)
Adrenocortical steroidogenesis : the effects of prostaglandins.
J. Clin. Invest. 1972, 51, 2246-2251

160 - SATO (G.H.), ROSSMAN (T.), EDELSTEIN (L.), HOLMES (S.), BUONASSISI (V.)
Phenotypic alterations in adrenal tumor cultures.
Science 1965, 148, 1733-1734

161 - SCHIMMER (B.P.)
Phenotypically variant adrenal tumor cell cultures with biochemical lesions in the ACTH-stimulated steroidogenic pathway.
J. Cell.Physiol. 1969, 74, 115-122

162 - SCHIMMER (B.P.)
Adenylate cyclase activity in adreno-corticotropic hormone sensitive and mutant adrenocortical tumor cell lines.
J. Biol. Chem. 1972, 247, 3134-3138

163 - SCHORR (I.), NEY(R.L.)
Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl-cyclase.
J. Clin. Invest. 1971, 50, 1295-1300

164 - SCHULSTER (D.), RICHARDSON (M.C.), MACKIE (C.)
The mode of ACTH action in stimulating steroidogenesis. The obligatory role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and the involvment of a rapidly turning over protein.
Biochem. J. 1972, 129, 8-9

165 - SERRANO (P.A.), DYRENFURTH (I.), VENNING(E.H.)
Steroid metabolism in a case of benign adrenocortical tumor.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1962, 22, 240-244

166 - SHAHIDI (N.T.)
Androgens and erythropoiesis.
N. Engl. J. Med. 1973, 289, 72-80

166 bis - SHARMA (R.K.), BRUSH (J.S.)
Metabolic regulation of steroidogenesis in adrenocortical carcinoma cells of rat. Effect of adrenocorticotropin and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate on the incorporation of (20S)-20 hydroxy (7α-^{3}H)cholesterol into deoxycorticosterone and corticosterone.
Biochem. Biophys. Res. Cmmun. 1974, 56, 256-263

167 - SHIMA (S.), MITSUNAGA (M.), KAWASHIMA (Y.), TAGUCHI (S.), NAKAO (T.)
Studies on cyclic nucleotides in the adrenal gland. IV. Effects of ACTH on cyclic nucleotides-dependent protein-kinases in the adrenal gland.
Endocrinology 1974, 94, 650-654

168 - SJÖVALL (J.), SJÖVALL (K.)
Identification of 5α-pregnane- 3α,20α,21-triol in human.
Steroids 1968, 12, 359-366

169 - SJÖVALL (J.), VIHKO (R.)
Identification of 3β,17β-dihydroxy-androst-5-ene, 3β,20α-dihydroxypregn-5-ene and epiandrosterone in human peripheral blood.
Steroids, 1966, 7, 447-458

170 - SLAGA (T.J.), KRUM (A.A.)
Modification of rabbit adrenal steroid biosynthesis by prolonged ACTH administration.
Endocrinology 1973, 93, 517-526

171 - SNELL (K.C.), STEWART (H.L.)
J. Nat. Canc. Inst. 1959, 22, 1119

172 - SOLOMON (S.), CARTER (A.C.), LIEBERMAN (S.)
The conversion in vivo of 17α-hydroxypregnenolone to dehydroisoandrosterone and other 17-ketosteroids.
J. Biol. Chem. 1960, 235, 351-355

173 - TAIT (S.A.S.), TAIT (J.F.), GOULD (R.P.), BROWN (B.L.), ALBANO (J.D.M.)
The preparation and use of purified and unpurified dispersed adrenal cells and a study of the relationship of their cAMP and steroid output.
J. Steroid Biochem. 1974, 5, 775-787

174 - TREMOLIERES (F.), TARDIEU(A.), CARTEAUD (A.), NORMAND (E.)
Cancer aigu généralisé d'origine cortico-surrénale à forme septicémique.
Bull. Soc. Med. Hôp. Paris 1930, 54, 710-717

175 - TSWETT (M.)
Ber. Deut. Bot. Gres. 1906, 24, 318

176 - UNGAR (F.), DORFMAN (R.I.)
Incorporation of ^{14}C in the urinary steroids in vivo.
J. Biol. Chem. 1953, 205, 125-132

177 - UNGAR (R.F.), KAN (K.W.), MAC COY (K.E.)
Activator and inhibitor factor in cholesterol side chain cleavage.
Ann. N.Y.Acad. Sci. U.S. 1973, 212, 276-289

178 - VAGUE (J.), CODACCIONI(J.L.), COULOMB(J.), FARRISSE (A.), GRISOLI(J.) PAYAN (H.)
Tumeur cortico-surrénale virilisante de l'adulte . I.Etude anatomo-clinique .
Ann. Endocrinol. Paris 1965, 26, 559-566

179 - VANDENHEUVEL (W.J.A.), HORNING (E.C.)
A study of retention-time relationship in gas-chromatography in terms of the structure of steroids.
Biochim. Biophys. Acta 1962, 64, 416-429

180 - VANDENHEUVEL (W.J.A.), SWEELEY (C.C.), HORNING(E.C.)
Separation of steroids by gas chromatography.
J. Amer. Chemic. Soc. 1960, 82, 3481-3486

181 - VERMEULEN (A.), VERDONCK (L.), VAN DER STRAETEN (M.), ORIE (N.)
Capacity of the testosterone-binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1969, 29, 1470-1480

182 - VIHKO (R.)
Gas chromatographic-mass spectrometric studies on solvolyzable steroids in human peripheral plasma.
Acta endocrinol. 1966, suppl. 109, 67 p.

183 - VILLEE (D.B.), ROTNER (H.), KLIMAN (B.), BRIEFER (C.), FEDERMAN (D.D.)
Androgen synthesis in a patient with virilizing adrenocortical carcinoma.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1967, 27, 1112-1122

184 - VILLEE (D.B.), VILLEE (C.A.), ENGEL (L.L.), TALBOT (N.B.)
Desoxycorticosterone synthesis by human adrenocortical tissue.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1962, 22, 481-489

185 - WALLACE (E.Z.), LIEBERMAN (S.)
Biosynthesis of dehydroisoandrosterone sulfate by human adrenocortical tissue.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1963, 23, 90-94

186 - WALTON (G.M.), GILL (G.N.)
Adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase dependent phosphorylation of ribosomal protein.
Biochemistry 1973, 12, 2604-2611

187 - WALTON (G.M.), GILL (G.N.), ABRASS (I.B.), GARREN (L.D.)
Phosphorylation of ribosome associated protein by a cyclic AMP-dependent protein-kinase : location of the microsomal receptor and protein-kinase.
Proc. Nat. Acad.Sci.U.S.1971, 68, 380-384

188 - WEINSTEIN (R.L.), KLIMAN (B.), NEEMAN (J.), COHEN (R.B.)
Deficient 17-hydroxylation in a corticosterone-producing adrenal tumor from an infant with hemihypertrophy and visceromegaly.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1970, 30, 457-468

189 - WERK (E.E.), SHOLITON (L.J.), KALEJS (L.)
Testosterone secreting adrenal adenoma under gonadotropin control.
N. Engl. J. Med. 1973, 289, 767-770

190 - WEST (C.D.), KUMAGAI (L.F.), SIMONS (E.L.), DOMINGUEZ (O.V.), BERLINER (D.L.
Adrenocortical carcinoma with feminization and hypertension associated with a defect in 11β-hydroxylation.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1964, 24, 567-579

191 - WIELAND (R.G.), DE COURCY (C.), HIRSCHMANN (H.)
Detection of 3β,17-dihydroxypregn-5-en-20-one in blood from a human adrenal tumor.
Steroids 1963, 2, 61-70

192 - WILSON (H.), LIPSETT (M.B.), RYAN (D.W.)
Urinary excretion of Δ5-pregnene-triol and other 3β-hydroxy-Δ5-steroids by subjects with and without endocrine disease.
J. clin. Endocrinol. Metab. 1961, 21, 1304-1319

193 - YASUMURA (Y.), BUONASSISI (V.), SATO (G.)
Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures.
I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype.
Cancer Res. 1966, 26, 529-532

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

HISTORIQUE - GENERALITES 4

OBSERVATION 6

ETUDE BIOLOGIQUE 38

RAPPEL CLINIQUE 39

I. Le syndrome endocrinien 41

II. le syndrome tumoral ; 42

III. Formes cliniques résultant de l'association de ces deux syndromes . 43

IV. Formes à type d'hirsutisme isolé 44

RAPPEL PHYSIOLOGIQUE

I. La stéroïdogenèse normale 47

II. Les interconversions périphériques 51

III. le catabolisme et l'élimination urinaire des stéroïdes 55

IV. La régulation de la stéroïdogenèse 58

ETUDE BIOLOGIQUE DES CORTICOSURRENALOMES VIRILISANTS
(Synthèse des connaissances actuelles)

I. ETUDE QUALITATIVE STATIQUE DES METABOLITES URINAIRES . . . 68

II. ASPECT QUANTITATIF 79

III. LA STEROIDOGENESE TUMORALE 83

A. les études radio-isotopiques in vivo 83

B. l'étude des stéroïdes tumoraux 84

C. les incubations de tissus tumoraux en présence de précurseurs marqués 85

D. étude de la sécrétion tumorale par la comparaison des taux des stéroïdes dans le sang veineux surrénalien et périphérique, et la détermination des taux de sécrétion et des clearances métaboliques 88

IV. ETUDE DYNAMIQUE ET ASPECTS PATHOGENIQUES 91

A. les données de l'exploration fonctionnelle classique . . 91

B. étude des mécanismes de l'action de l'ACTH dans les tumeurs cortico-surrénaliennes : phénomènes membranaires et intracellulaires 92

1. les tumeurs corticosurrénaliennes chez l'animal 92

2. les tumeurs corticosurrénaliennes humaines 94

Pages

APPLICATION DES TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE (CGL) ET DE CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CGL-SM) A L'OBSERVATION PRESENTEE 101

I. PRINCIPE DES ANALYSES PAR CGL ET CGL-SM 101

II MATERIEL ET METHODES 108

III. RESULTATS 114

A. étude qualitative 114

B. étude quantitative 181

C. synthèse des résultats 188

ETUDE IN VITRO DU MECANISME D'ACTION DE L'ACTH DANS L'OBSERVATION PRESENTEE 192

DISCUSSION 194

I. MISE EN RELATION DES SYMPTOMES CLINIQUES AVEC LE PROFIL BIOLOGIQUE 195

II. LA STEROIDOGENESE TUMORALE 198

III. PATHOGENIE DE L'AUTONOMIE TUMORALE 203

IV. LA RECHERCHE DE CRITERES DE BENIGNITE 204

CONCLUSIONS 206

BIBLIOGRAPHIE 208